

Dreidimensionale Darstellung der Aquaporin2-Expression in der Entwicklung der Mausniere

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN (DR. MED)
DER FAKULTÄT FÜR
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Martina Maier
aus Deggendorf

2010

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz am Institut für Physiologie an der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht im Dezember 2010.

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Nierenentwicklung	7
1.2	Funktionen der Niere.....	10
1.3	Aufbau und Ausscheidungsfunktion der Niere	11
1.4	Aquaporin.....	12
1.4.1	Die Verteilung der Aquaporine bei Säugetieren	12
1.4.2	Aquaporine in der Niere	14
1.4.3	Molekularer Aufbau des Kanalproteins Aquaporin2	15
1.4.4	Die Signalkaskade zum Einbau von Aquaporin2.....	17
1.4.5	Medizinische Bedeutung von Fehlern im Aquaporin2-System	19
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte und Instrumente	22
2.1.2	Verbrauchsmaterial	25
2.1.3	Chemikalien	26
2.1.4	Puffer und Lösungen Immunhistochemie	28
2.1.5	Puffer und Lösungen Molekularbiologie	29
2.1.6	Oligonukleotide	30
2.1.7	Antikörper	30
2.1.8	Software, Internetdienste und weitere Hilfsmittel.....	30
2.2	Histologische Methoden.....	31
2.2.1	Haltung der Versuchstiere	31
2.2.2	Entnahme und Fixierung der Organe	31
2.2.3	Einbettung in Paraffin	32
2.2.4	Anfertigung von Serienschnitten.....	32
2.2.5	Entparaffinierung	32
2.2.6	Immunhistochemie	32
2.3	Dreidimensionale Rekonstruktion.....	34
2.3.1	Mikroskopie und Fotografie.....	34

2.3.2	Nachbearbeitung im Programm ImageJ	35
2.3.3	Rekonstruktion der Nieren mit dem Programm Amira	35
2.3.4	Volumenberechnung	38
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	39
2.4.1	RNA-Isolierung	39
2.4.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	39
2.4.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Entwicklung des arteriellen Gefäßbaums.....	42
3.2	Signalverteilung des Kanalproteins Aquaporin2.....	44
3.3	Zelluläre Analyse von Aquaporin2	58
3.3.1	Verteilung von Glattmuskelaktin und Aquaporin2 innerhalb der Niere	58
3.3.2	Verteilung von Aquaporin2 in den Hauptzellen der Sammelrohre	61
3.4	Quantifizierung der Aquaporin2-Expression während der Nierenentwicklung	67
4	Diskussion.....	72
4.1	Zeitlich-räumliche Verteilung von Aquaporin2 in der Mausniere	73
4.2	Harnkonzentrierung bei verschiedenen Tieren und beim Menschen im Laufe ihrer Entwicklung	75
4.3	Intrazelluläre Verteilung von Aquaporin2	76
4.4	Quantifizierung des Aquaporin2-Volumens im Laufe der Nephrogenese.....	78
4.5	Diskrepanz der erwarteten Ergebnisse im Stadium E17 und E18.....	79
4.6	Ausblick	81
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	84
7	Abbildungsverzeichnis.....	93
8	Abkürzungsverzeichnis	97

1 Einleitung

1.1 Nierenentwicklung

Im Laufe der Embryogenese entwickeln sich nacheinander drei zeitlich und räumlich getrennte Nierenanlagen, der Pronephros, der Mesonephros und der Metanephros. Nur der Metanephros bleibt als endgültiges Ausscheidungsorgan bestehen. Teile der ersten beiden Nierenanlagen bilden sich wieder zurück oder werden in das Genitalsystem integriert (Saxén, 1987).

Die Entwicklung des Metanephros beginnt in der Maus am Entwicklungstag 10,5-11 mit der Entstehung eines mesenchymalen Blastems (Saxén, 1987). Beim Menschen setzt die Entstehung des Metanephros in der 5. Entwicklungswoche ein (Kanwar et al., 2004; Saxén, 1987).

In die mesenchymale Zellverdichtung wächst eine Knospe, die aus dem kaudalen Teil des Wolff'schen Ganges entstanden ist (Clark und Bertram, 1999). Diese Knospe ist epithelialen Ursprungs. Durch die Wechselwirkung der Mesenchymverdichtung und der Ureterknospe, beides mesodermale Gewebe, beginnt sich die Ureterknospe dichotom zu teilen. Beim Menschen zunächst in einem Winkel von 180° , dann asymmetrisch in immer kleiner werdenden Winkeln. Aus den ersten Teilungen entstehen durch Erweiterung das Nierenbecken, die Nierenkelche und die Papille. Die ersten Sammelrohre entstehen demnach erst nach 6 - 11 dichotomen Teilungen des Ureters (Saxén, 1987) (Abbildung 1.1). Die humane Niere besitzt 8 - 12 Papillen (Schiebler und Schmidt, 2003), die Mausniere ist monopapillär (Saxén, 1987).

Basierend auf der Annahme, dass sich die Ureterknospe stets dichotom teilt, berichten Cebrián et al. (2004), dass bei der Maus 10-11 dichotome Teilungen in Utero stattfinden.



Abbildung 1.1: Schematische Zeichnung der frühen Entwicklung des menschlichen Nierenbeckens (nach Saxén, 1987)

Auch Glykoproteine der extrazellulären Matrix, Enzyme, welche die extrazelluläre Matrix abbauen und ihre Gegenspieler, CAMs, Integrine, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren sowie verschiedene Protoonkogene spielen für die Wechselwirkungen des epithelialen und mesenchymalen Gewebes eine Rolle (Burrow, 2000; Clark und Bertram, 1999; Kanwar et al., 2004; Kuure et al., 2000; Wallner et al., 1998) (Abbildung 1.2).

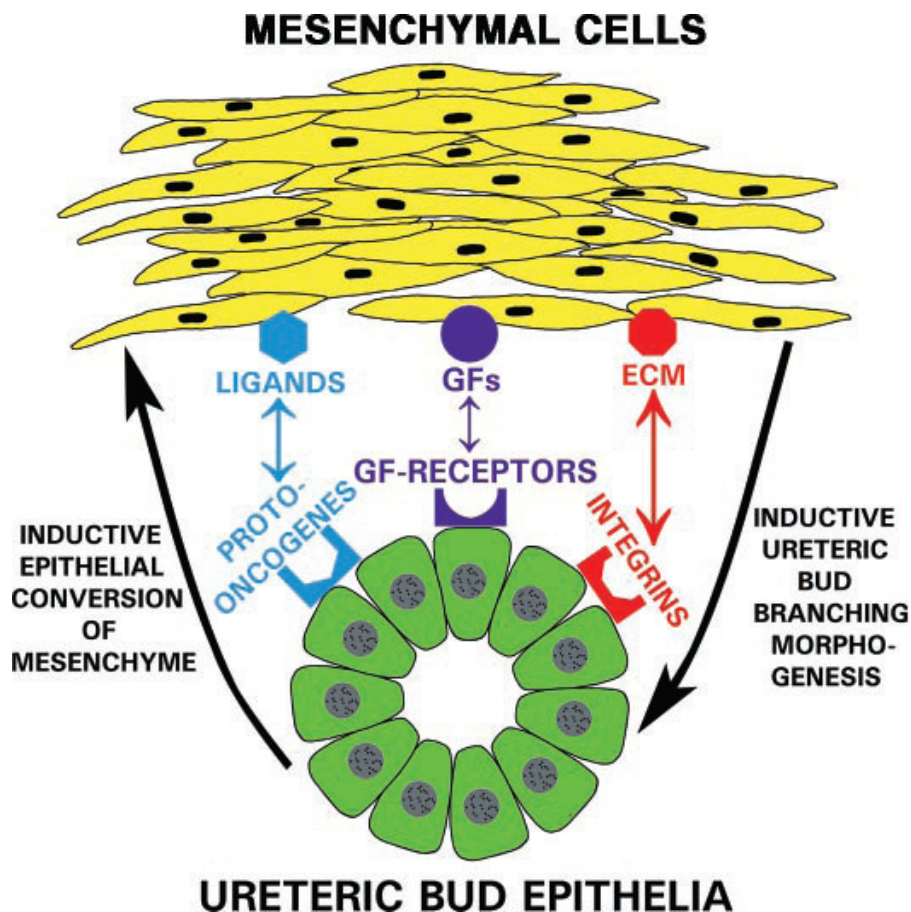


Abbildung 1.2: Wechselwirkungen zwischen den undifferenzierten Mesenchymzellen und der Ureterknospe (nach Kanwar et al., 2004)

Im Rahmen der Nephronbildung entstehen aus der Mesenchymverdichtung durch Teilung in unmittelbarer Nähe der Aufzweigungen der Ureterknospe globuläre Aggregate, deren Zellen sich polarisieren und in epitheliales Gewebe umwandeln (Horster et al., 1997). Diese präglomerulären Zellverdichtungen nehmen zunächst eine kommaförmige Gestalt an und werden schließlich s-förmig (Abbildung 1.3). Zu diesem Zeitpunkt beginnen sich die Zellen zu diversifizieren. Die Zellen der zukünftigen Bowmankapsel flachen sich ab und aus Zellen mit Lektinbindekazapazität entstehen die späteren Podozyten.

Alle Stadien der glomerulären und tubulären Entwicklung können in der Niere einer neugeborenen Maus auf histologischen Schnitten zeitgleich gesehen werden. Während in der Nähe der Kapsel unreife Glomeruli und Nephronsegmente dominieren, sind die Nephronsegmente in tieferen Rindenschichten bereits ausgereift (Wallner et al., 1998).

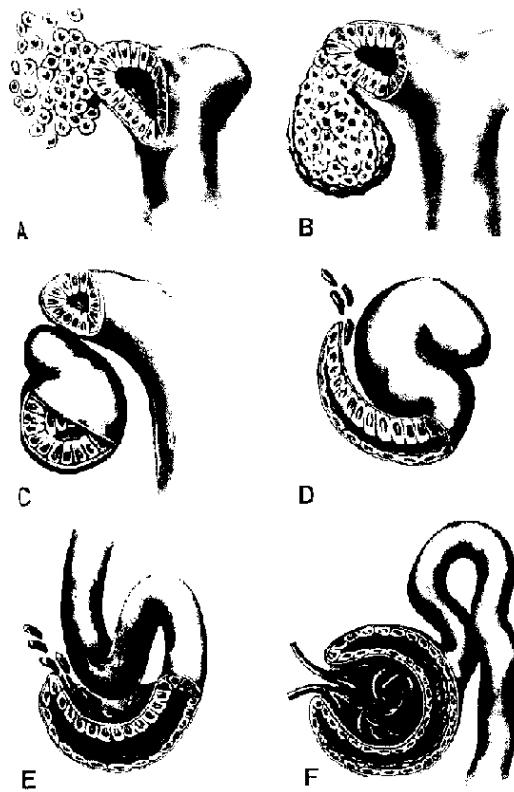


Abbildung 1.3: Nephronentwicklung (nach Saxén, 1987).

A: Induktion. B: Aggregation und Beginn der Epithelialisierung. C: Kommaförmiges Stadium. D: S-förmiges Stadium. E: Migration endothelialer Zellen. F: Glomerulogenese.

Die verschiedenen Segmente des Nephrons entstehen durch mitotische Teilungen (Saxén, 1987) (Abbildung 1.4). Dadurch gewinnen die Glomeruli Anschluss an das Sammelrohrsystem (Horster et al., 1997), wobei jeweils mehrere Nephrone arkadenförmig in ein Sammelrohr münden (Saxén, 1987). Während das Sammelrohrsystem aus der Ureterknospe entsteht (Saxén, 1987), sind die Zellen vom proximalen bis zum distalen Tubulus mesenchymalen Ursprungs (Stuart et al., 1995).

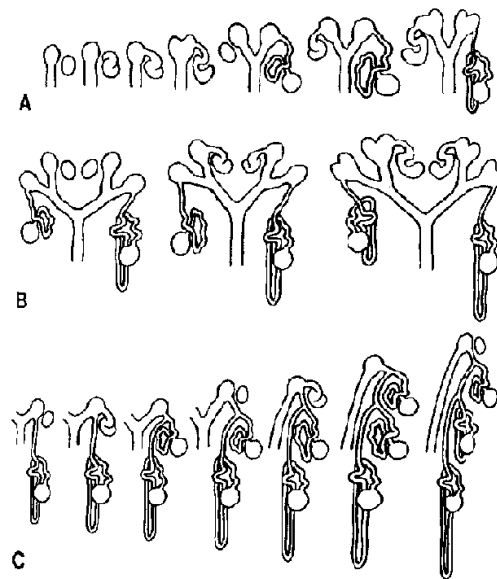


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Nephronentwicklung. A, B: unreifes Nephron. C: Bildung von Arkaden. (nach Saxén, 1987)

Die entstehenden Nephrene ziehen endotheliale Zellen an, welche die Vaskularisierung der Glomeruli bewirken und sie so erst funktionsfähig machen (Horster et al., 1997; Saxén, 1987) (Abbildung 1.3).

Beim Menschen ist die Nephrogenese mit der Geburt abgeschlossen, bei Nagern hält die Entwicklung noch 8 - 10 Tage nach der Geburt an (Clark und Bertram, 1999).

1.2 Funktionen der Niere

Die Niere fungiert im Körper einerseits als Ausscheidungsorgan, andererseits übernimmt sie verschiedene regulatorische Funktionen.

Die Hauptfunktion der Niere ist die Ausscheidung von überflüssigen oder toxischen Substanzen, die den Körper nur über die Niere verlassen können (sog. harnpflichtige Substanzen). Zu diesen Substanzen zählen sowohl körpereigene Stoffwechselprodukte wie z.B. Harnstoff, Harnsäure oder Ammoniak, als auch einige Pharmaka und Giftstoffe. Für den Körper wertvolle Substanzen wie Glukose und Aminosäuren werden bei der Filtration des Blutes zurückgehalten bzw. wieder resorbiert.

Die zweite wichtige Funktion der Niere ist die Regulation des Elektrolyt-, Wasser-, Mineral- und Säure-Basen-Haushaltes:

Über die Wasser- und NaCl-Ausscheidung kontrolliert die Niere das Volumen und die Elektrolyt-Zusammensetzung des Extrazellulärraums. Der Blutdruck wird unter anderem über

das Plasmavolumen und das von der Niere gebildete Hormon Renin geregelt. Außerdem wirkt die Niere durch ihren Einfluss auf die Plasmakonzentration von Calcium und Phosphat an der Mineralisierung des Knochens mit. Das für die Einlagerung von Calcium wichtige Hormon Calcitriol wird von der Niere aus einer Vorstufe, die in mehreren Schritten in der Leber und der Haut gebildet wurde, synthetisiert. Durch die Ausscheidung von H^+ und HCO_3^- beeinflusst die Niere den Säure-Basen-Haushalt. Außerdem betreibt die Niere Glukoneogenese, wobei sie das nach der Desaminierung von Glutamat übrige Kohlenstoffskelett für die Synthese von Glukose nutzt. Das Hormon Erythropoietin, das die Neubildung von Erythrozyten im Knochenmark stimuliert, wird ebenfalls in der Niere gebildet (Schmidt et al., 2005).

1.3 Aufbau und Ausscheidungsfunktion der Niere

Makroskopisch kann die Niere in verschiedene Zonen eingeteilt werden. Außen, unmittelbar unterhalb der Kapsel, befindet sich der Kortex. Ihm folgen von außen nach innen der äußere und innere Streifen der äußeren Medulla sowie der Bereich der inneren Medulla. Über die Papille gelangt der Harn in das Nierenbecken (Greger et al., 1995) (Abbildung 1.5).

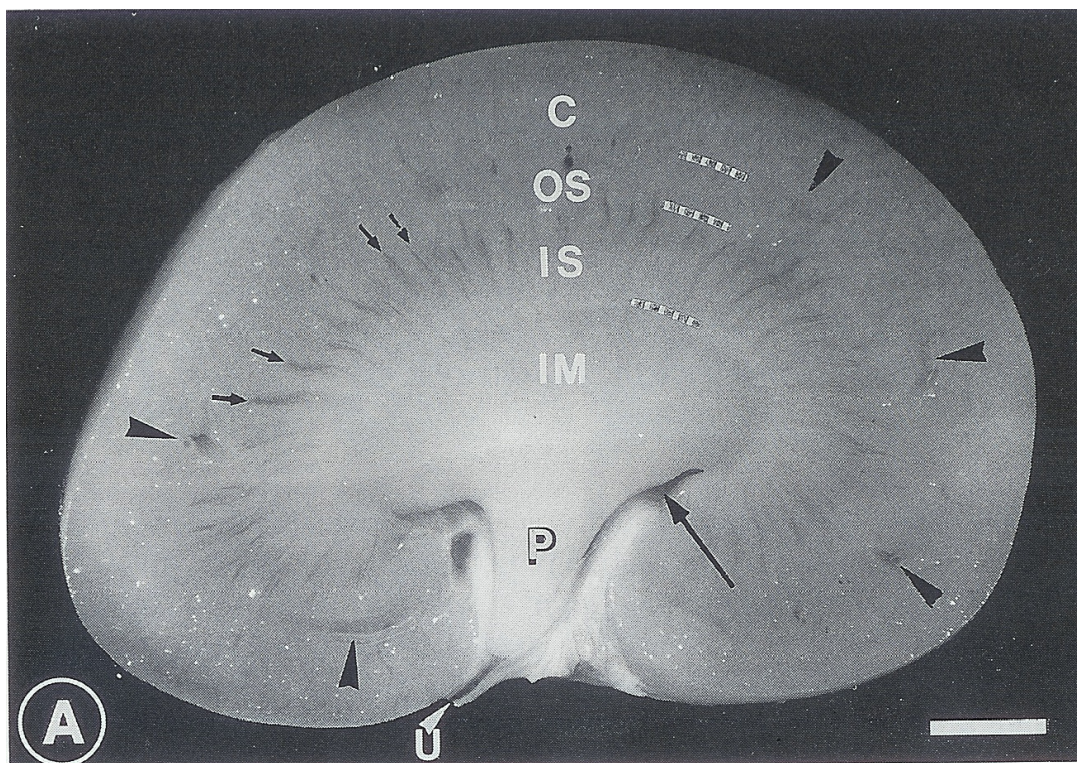


Abbildung 1.5: Makroskopische Gliederung der Nierenzonen. C: Kortex, OS: äußerer Streifen der äußeren Medulla, IS: innerer Streifen der äußeren Medulla, IM: Innere Medulla, P: Papille, U: Ureter (Greger et al., 1995)

Wie aus der Entwicklung der Niere ersichtlich ist, bestehen die Nieren aus zwei unterschiedlichen Komponenten: aus den mesenchymalen Nephronen und aus dem epithelialen Sammelrohrsystem.

Eine menschliche Niere besitzt etwa 1 Million Nephrone, die jeweils aus einem Glomerulum und einem Tubulussystem aus proximalem Tubulus, Henle-Schleife, distalem Tubulus und Verbindungstubulus bestehen (Schmidt et al., 2005). Die Anzahl der Nephrone kann aber zwischen 300 000 und mehr als 1 Million variieren (Clark und Bertram, 1999). Die adulte Mausnieren besitzt mehr als 8000 reife Nephrone (Georgas et al., 2008).

In den Glomeruli wird das Blut filtriert. Beim Menschen werden täglich ca. 150 Liter Primärharn durch das Endothel der Kapillaren, die Basalmembran und eine Schlitzmembran aus Podozytenfortsätzen gepresst. Im nachfolgenden Tubulussystem wird dieser Primärharn größtenteils wieder resorbiert, um einem zu großen Flüssigkeits- und Mineralstoffverlust durch die glomeruläre Filtration entgegen zu wirken. Bei diesem Prozess spielt die Macula densa eine wichtige Rolle, indem sie je nach Salzgehalt des Primärharns im distalen Tubulus durch Modulation des Gefäßdurchmessers des zuführenden Vas afferens die glomeruläre Filtration reguliert. Über den Verbindungstubulus ist das mesenchymale Tubulussystem an das epitheliale Sammelrohrsystem angeschlossen, in dem mit Hilfe von Vasopressin-abhängigen Wasserkanälen, dem Aquaporin2 (AQP2), das Wasser abhängig vom Druck im Gefäßsystem des Körpers retiniert wird, bevor es über den Ureter in die Harnblase fließt und ausgeschieden wird (Schmidt et al., 2005).

Der Mensch besitzt etwa 300 Sammelrohre. In ein Sammelrohr münden ca. 3000 Verbindungstubuli (Schmidt et al., 2005).

Die neonatale Maus hat etwa 7600-8400 Nierenkörperchen. Über 1400 bis 1800 Sammelrohre fließt der gebildete Harn in das Nierenbecken (Cebrián et al., 2004). Demnach münden vier bis sechs Verbindungstubuli in ein Sammelrohr.

1.4 Aquaporin

1.4.1 Die Verteilung der Aquaporine bei Säugetieren

Aquaporine sind hydrophobe, in die Zytoplasmamembran integrierte tetramere Kanalproteine mit einer Größe von ca. 30 kDa je Monomer (Verkman, 2005). Bisher hat man 13 verschiedene Subtypen von Aquaporinen in Säugetieren entdeckt (Krane und Goldstein, 2007). Viele von ihnen sind in Epithelien und Endothelien mit aktivem Flüssigkeitstransport lokalisiert. Aquaporine kommen auch in Zellen vor, die nicht am Flüssigkeitstransport

teilnehmen, wie z.B. in Hautzellen, im Fettgewebe und im Endothel der Harnblase. Die meisten Aquaporine sind in der Zytoplasmamembran lokalisiert. AQP2, ein Kanalprotein im Sammelrohrsystem der Niere, bildet dabei eine Ausnahme: es wird Vasopressin abhängig in die Plasmamembran eingebaut und wieder via Endozytose in Vesikel aufgenommen und recycled. AQP0, AQP1, AQP2, AQP4 und AQP5 lassen ausschließlich Wasser passieren, wohingegen AQP3, AQP7, AQP9 und AQP10 neben Wassermolekülen auch Glycerol und möglicherweise andere kleine gelöste Salze durchlassen. Aus diesem Grund werden sie auch Aquaglyceroporine genannt (Krane et al., 2007; Verkman, 2005). AQP8 ist vor allem für den Ammoniaktransport zuständig (Saparov et al., 2007). Abbildung 1.6 zeigt die Verteilung der bis jetzt identifizierten Aquaporine bei Säugetieren.

AQP	Permeabilität	Expression im Gewebe
AQP0	Wasser	Augenlinse
AQP1	Wasser	Nierentubuli, Endothel, Erythrozyten, Plexus choroideus
AQP2	Wasser	Sammelrohre der Niere
AQP3	Wasser, Glycerol, Harnstoff	Sammelrohre, Harnblase, Epidermis, Atemwege, Konjunktiva
AQP4	Wasser	Sammelrohre, Astroglia, Drüsenepithel, Atemwege, Skelettmuskel, Magen, Retina
AQP5	Wasser	Drüsengewebe, Kornea, Alveolarepithel, Gastrointestinaltrakt
AQP6	Chlorid	Zwischenzellen der Sammelrohre
AQP7	Wasser, Glycerol, Harnstoff	Fettgewebe, Hoden, proximaler Tubulus der Niere
AQP8	Ammoniak, Wasser, Harnstoff	Leber, Pankreas, Darm, Speicheldrüse, Hoden, Herz
AQP9	Wasser, Glycerol, kleine gelöste Salze, Harnstoff	Leber, Leukozyten, Hoden, Gehirn
AQP10	Wasser, Glycerol, Harnstoff	Dünndarm
AQP11	unbekannt	Niere, Leber
AQP12	unbekannt	Azinuszellen des Pankreas

Abbildung 1.6: Expression einzelner Aquaporine bei Säugetieren (nach Krane et al., 2007 und Verkman, 2005)

1.4.2 Aquaporine in der Niere

Nach heutigem Wissensstand geht man davon aus, dass es mindestens sieben verschiedene Typen von Aquaporinen in der Niere gibt (Nielsen et al., 2002; Abbildung 1.7). AQP1 wird im proximalen Tubulus und im absteigenden Schenkel der Henle Schleife exprimiert (Agre et al., 1998). Seine Expression, sowohl luminal, als auch basolateral, deutet darauf hin, dass es für transzelluläre Transportvorgänge verantwortlich ist (Nielsen et al., 1993).

Von dem im Hypothalamus gebildeten Hormon Vasopressin, oder auch antidiuretisches Hormon (ADH) genannt, wird vor allem AQP2 stimuliert. Dies konnte an Hand der zellulären Verteilung (Fushimi et al., 1993) und der Korrelation zwischen der AQP2-Expression und der Wasserpermeabilität sowohl bei Ratten (DiGiovanni et al., 1994), als auch in isolierten Sammelrohren (Nielsen et al., 1995) nachgewiesen werden. AQP2 ist vor allem in den Hauptzellen der Sammelrohre lokalisiert (Fushimi et al., 1993), aber auch in geringerer Konzentration in den Verbindungstubuli (Kishore et al., 1996). Seine Funktion ist die Aufnahme von Wasser aus dem Tubuluslumen in die Hauptzellen der Sammelrohre. AQP2 wird vor allem apikal exprimiert. Zudem kommt es intrazellulär in Vesikeln und auf der basolateralen Membranseite vor (Nielsen und Harris et al., 1993). Wasser gelangt über AQP2 in die Zelle und wird über AQP3 und AQP4 auf der basolateralen Seite aus der Zelle transportiert (Echevarria et al., 1994; Ishibashi et al., 1994; Robben et al., 2006; Yasui et al., 1999).

In den Zwischenzellen der Sammelrohre sowie im Glomerulum und im proximalen Tubulus findet sich AQP6 (Nielsen et al., 2002; Yasui et al., 1999). Außerdem wurden AQP7 und AQP8 in der Niere entdeckt (Nielsen et al., 2002).

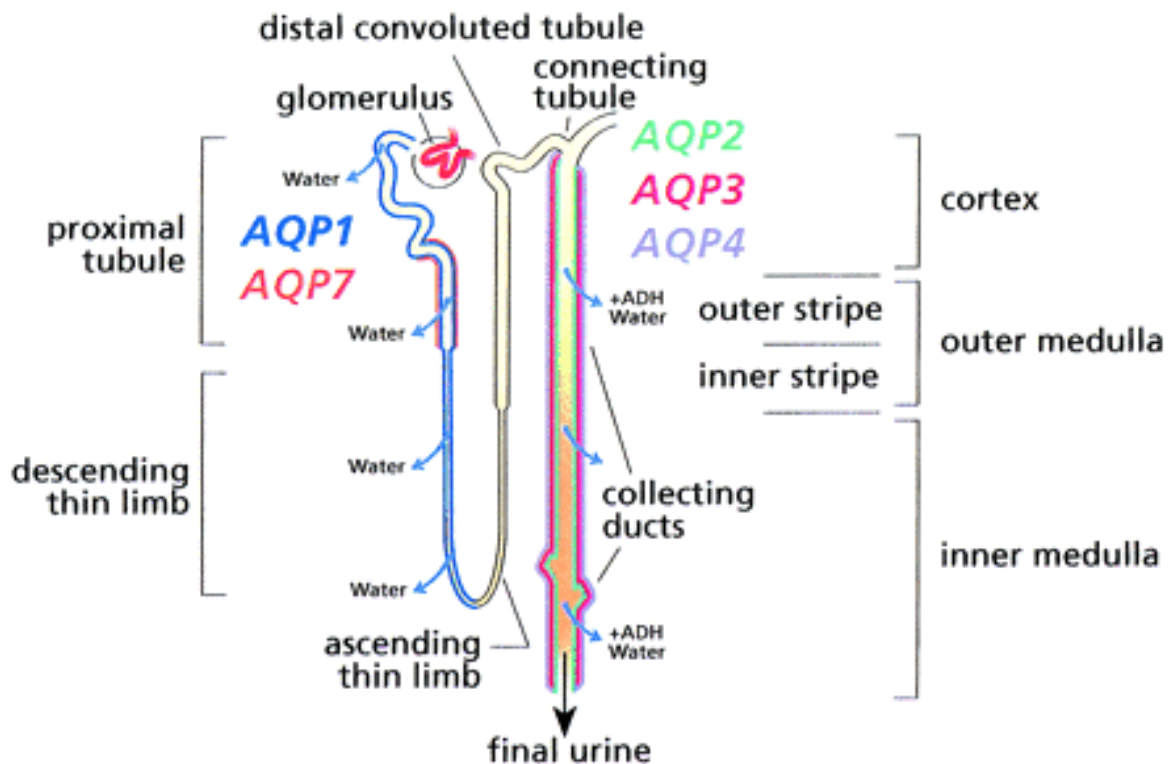


Abbildung 1.7: Die Verteilung der verschiedenen Aquaporine innerhalb des Tubulussystems. AQP1: proximaler Tubulus und absteigender Teil der Henle-Schleife. AQP2: Hauptzellen der Sammelrohre, apikal. AQP3/AQP4: Hauptzellen der Sammelrohre, basolateral. AQP7: apikaler Bürstensaum des geraden Anteils des proximalen Tubulus. (nach Nielsen et al., 2002)

1.4.3 Molekularer Aufbau des Kanalproteins Aquaporin2

Aquaporine sind als Tetramere organisiert. Ein Monomer besitzt 6 Transmembrandomänen (Robben et al., 2006; Krane et al., 2007) (Abbildung 1.8). Sowohl der N-Terminus, als auch die Carboxy-Gruppe liegen intrazellulär (Agre et al., 1998) und haben Tandemwiederholungen, die wahrscheinlich auf eine frühere Genduplikation zurückzuführen sind (Nielsen et al., 1999). Die beiden Enden des Transmembranproteins AQP2 sind sich in ihrem Aufbau sehr ähnlich, aber entgegengesetzt symmetrisch (Nielsen et al., 1999). Das heißt, die ersten drei Transmembrandomänen und ihre Verbindungsschleifen sind symmetrisch zur anderen Hälfte, als ob das Protein um 180° gedreht wäre (Petrović et al., 2006). Für den transmembranären Wassertransport ist die Tandemwiederholung Asparagin-Prolin-Alanin (NPA) verantwortlich, die durch eine enge Windung einen Kanal ähnlich einer Sanduhr in der Membran formt (Jung et al., 1994; Nielsen et al., 1999). Zu diesem Zweck treffen sich die Schleifen B und E im dreidimensionalen Modell (Robben et al., 2006; Abbildung 1.9).

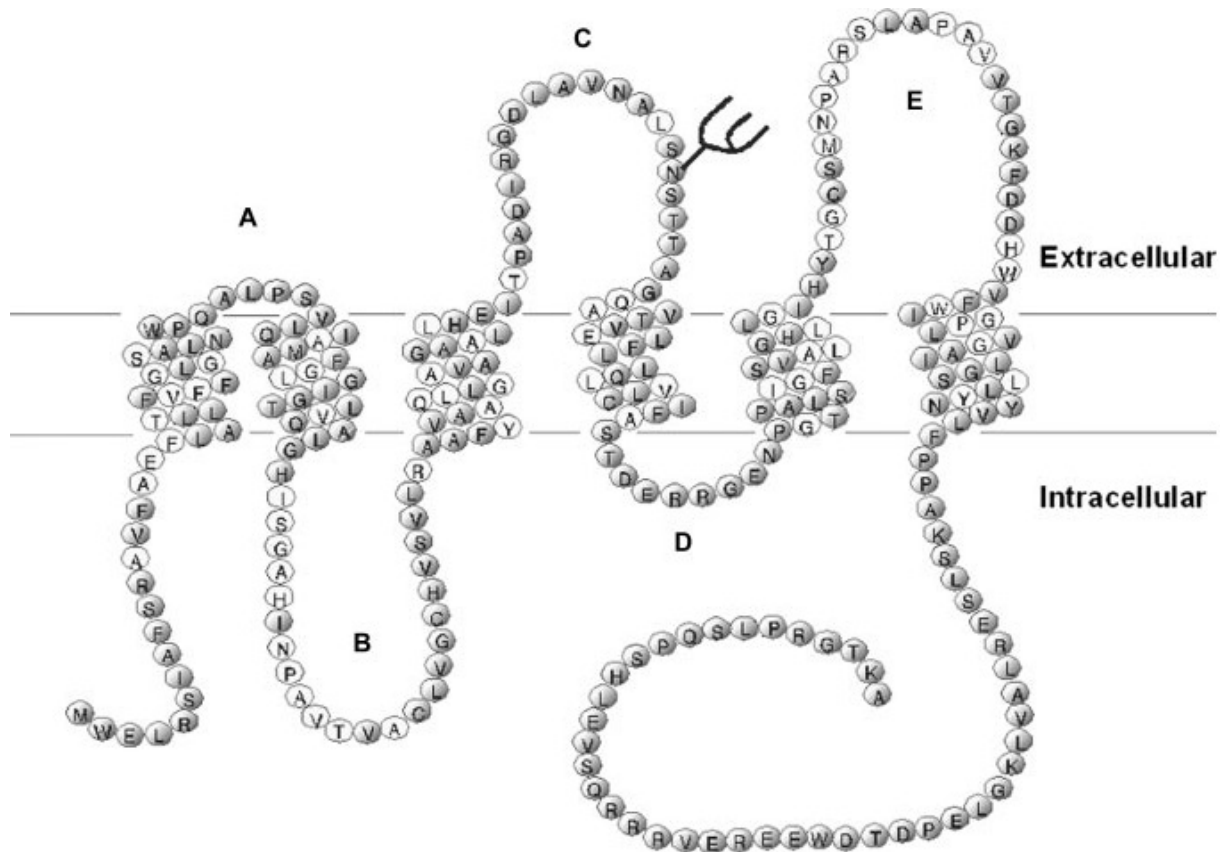


Abbildung 1.8: Aminosäureaufbau des Kanalproteins Aquaporin2 (nach Robben et al., 2006)

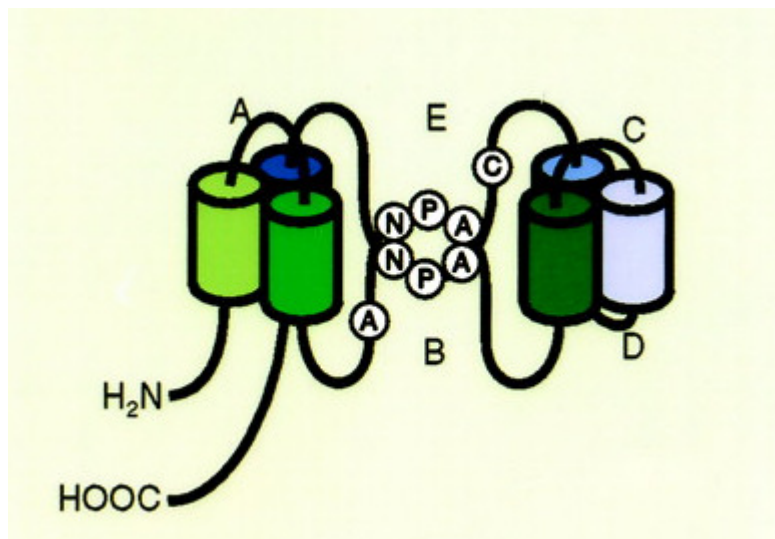


Abbildung 1.9: Modell für die Kanalbildung von Aquaporinen. Die Schleifen B und E treten in die Plasmamembran ein. Die Aminosäuresequenz NPA bildet eine Pore, durch die Wasser aus dem Lumen in die Zelle fließen kann. (nach Nielsen et al., 2002)

1.4.4 Die Signalkaskade zum Einbau von Aquaporin2

Osmorezeptoren im Hypothalamus nehmen eine erhöhte Serumosmolarität und eine Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens wahr. Dies führt zur Produktion des antidiuretischen Hormons ADH, oder auch Vasopressin genannt. Wenn Vasopressin an seinen Rezeptor im Sammelrohrsystem, den V_2 -Rezeptor, bindet, wird die α -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins aktiviert. Die α -Untereinheit gibt GDP ab und nimmt stattdessen GTP auf. Dies führt zur Abkopplung von der β - und γ -Untereinheit. Infolgedessen wird mit Hilfe des Enzyms Adenylatzyklase ATP zu cAMP umgewandelt. cAMP bewirkt die Aktivierung des Enzyms Proteinkinase A (Noda und Sasaki, 2004). Proteinkinase A phosphoryliert AQP2 am Serin 256 (Fushimi et al., 1997) (Abbildung 1.10B). Für die Insertion von AQP2 in der apikalen Zellmembran ist der C-Terminus essentiell (Shi et al., 2007). Zum Einen befindet sich die Aminosäure Serin 256, die von der Proteinkinase A aktiviert wird, am Carboxy-Terminus (Fushimi et al., 1997; Kamsteeg et al., 2000; Mulders et al., 1998; Nishimoto et al., 1999), zum Anderen spielt die Strecke von N220 bis S229 für den Einbau an der apikalen Zytoplasmamembran eine entscheidende Rolle (Deen et al., 2002; van Balkom et al., 2004). Mindestens drei der vier Untereinheiten des tetrameren Proteins AQP2 müssen für einen Transport zur luminalen Membran phosphoryliert sein (Kamsteeg et al., 2000). Für diesen Transport sind sowohl der C-Terminus, als auch der N-Terminus wichtig (van Balkom et al., 2004). Elemente des Zytoskeletts, die Mikrotubuli, übernehmen für die Wanderung zur apikalen Plasmamembran eine zentrale Rolle (Philipps und Taylor, 1989; Philipps und Taylor, 1992). Wichtig für diesen Einbau ist auch Calcium, das wahrscheinlich Calmodulin-abhängig den AQP2-Einbau in die apikale Membran bewirkt (Chou et al., 2000). Der Einbau von AQP2 in die luminale Membran der Hauptzellen steigert die Wasserpermeabilität (Fushimi et al., 1997). Wasser kann aus dem Tubuluslumen dem osmotischen Gradienten folgend in die Hauptzellen und von dort über AQP3 und AQP4 in das Interstitium fließen (Abbildung 1.10A). Auf diese Weise wird Wasser rückresorbiert und der Urin konzentriert (Noda und Sasaki, 2004). Zudem wurde festgestellt, dass sich die mit AQP2 beladenen intrazellulären Vesikel in der Nähe von EEA1-positiven frühen Endosomen befinden. EEA1 ist nicht nur ein Marker der frühen Endosomen, sondern spielt auch bei endosomalen Andockprozessen eine Rolle (Tajika et al., 2004). Von dort gelangt AQP2 in Rab11-positive Speicher an der apikalen Plasmamembran (Takata et al., 2004) (Abbildung 1.10C). Dies suggeriert eine Wiederaufnahme von AQP2 aus der luminalen Membran und die erneute Verwendung des Kanalproteins bei zu hoher Serumosmolarität bzw. bei Volumenmangel. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Recyclingprozess mindestens sechs

mal stattfindet (Robben et al., 2006). Für die Wiederaufnahme von AQP2 muss dieses nicht erst dephosphoryliert werden. Die Wiederaufnahme ist auch im phosphorylierten Zustand möglich (Petrović et al., 2006). Die Elimination von AQP2 aus der luminalen Membran wird durch PGE2 gesteuert (Zelenina et al., 2000).

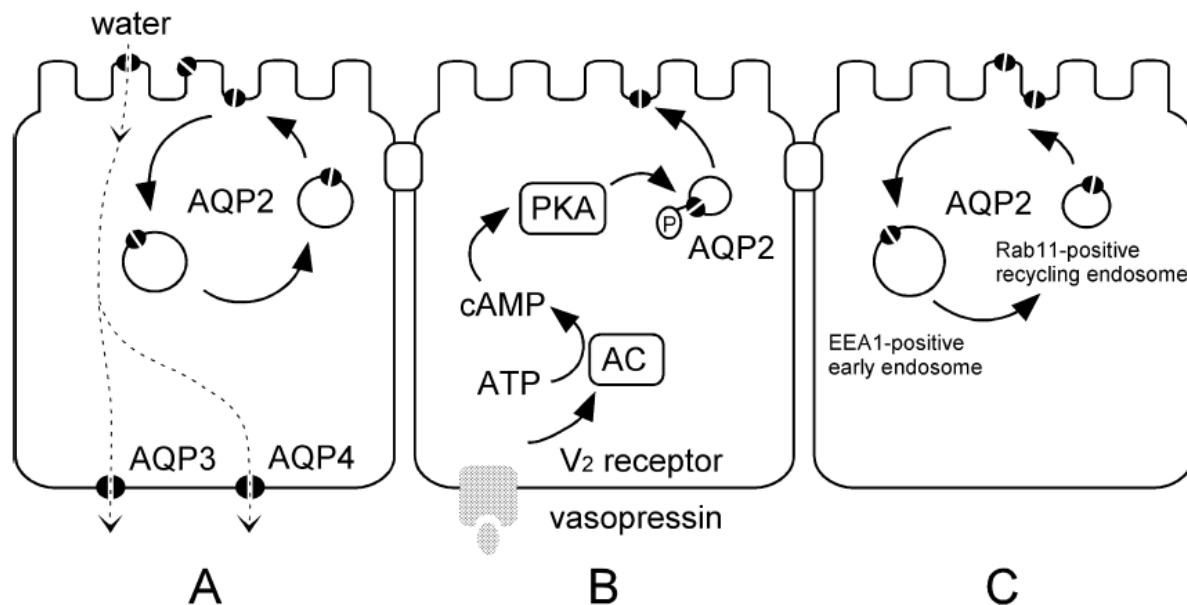


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Aktivierung (A,B) und des Recyclings (C) von AQP2
(nach Takata et al., 2004)

Die zentrale Bedeutung von Vasopressin für die Aktivierung der Signalkaskade zum Einbau von AQP2 wurde von Fushimi et al. (1993) und Nielsen et al. (1993) an Hand der zellulären Verteilung nachgewiesen. Auch Studien an Ratten, in denen eine direkte Korrelation zwischen der AQP2-Expression in den Sammelrohren und der Wasserpermeabilität nachgewiesen wurde, bestätigen diesen Sachverhalt (DiGiovanni et al., 1994). Das selbe Ergebnis brachten Studien an isolierten perfundierten Sammelrohren (Nielsen et al., 1995) und Tierexperimente (Nielsen et al., 2002): die osmotische Wasserpermeabilität korreliert mit den gemessenen AQP2-Spiegeln an der apikalen Plasmamembran.

Vasopressin spielt nicht nur bei der Kurzzeitregulation des AQP2-Systems eine Rolle, sondern triggert auch cAMP-abhängig die Langzeitregulation von AQP2. In der Promotorregion des murinen und humanen AQP2-Gen wurde eine cAMP-sensitive Region entdeckt (Maric et al., 1998).

In einer Studie von Hoffert et al. (2007) wurde festgestellt, dass AQP2 nicht nur am Serin 256, sondern auch am Serin 261 phosphoryliert werden kann. Dies wurde sowohl in den Verbindungstubuli, als auch in allen Abschnitten der Sammelrohre beobachtet. Die intrazelluläre Verteilung war unterschiedlich: im Verbindungstubulus apikal und basolateral, dagegen im Sammelrohr meist subapikal oder im Zytoplasma verteilt. Bis jetzt ist noch unklar, ob diese Phosphorylierung die Exozytose von AQP2 inhibiert oder seine Endozytose stimuliert. Auch die Signalkaskade, die zu dieser Phosphorylierung führt ist noch nicht erforscht.

1.4.5 Medizinische Bedeutung von Fehlern im Aquaporin2-System

Nephrogener Diabetes insipidus

Beim nephrogenen Diabetes insipidus reagiert die Niere unempfindlich auf die Stimulation mit Vasopressin. Dies kann einerseits auf einer X-chromosomalen Mutation im V₂-Rezeptor beruhen, andererseits kann auch eine autosomale Mutation im AQP2-Gen selber zu einem funktionsunfähigen Kanalprotein führen (Mulders et al., 1998; Nielsen et al., 1999). Diese Mutationen betreffen beim autosomal-dominanten nephrogenen Diabetes insipidus alle den C-Terminus (Shi et al., 2007), bei der autosomal-rezessiv vererbten Variante wurden Mutationen in den Transmembrandomänen nachgewiesen (Mulders et al., 1998).

Neben angeborenen Formen des nephrogenen Diabetes insipidus kann diese Erkrankung auch durch verschiedene Medikamente hervorgerufen werden. So führt beispielsweise eine Therapie mit Lithium zu einem Abfall der AQP2-Konzentration (Marples et al., 1995; Kwon et al., 2000). Auch eine chronische Hypokaliämie (Marples et al., 1996; Robben et al., 2006) oder chronisch erhöhte Spiegel von Calcium (Earm et al., 1998; Robben et al., 2006; Sands et al., 1998) verursachen eine Polyurie infolge verminderter AQP2-Expression an der apikalen Plasmamembran. Zudem wurde bei einer Obstruktion der Ureteren eine Abnahme der Expression von AQP1-4 (Li et al., 2001; Li et al., 2003; Nielsen et al., 1999) und Natrium transportierender Proteine (Robben et al., 2006) festgestellt. Zahlreiche Studien zeigen außerdem, dass mit der Abnahme der AQP2-Expression im Alter die Fähigkeit Urin zu konzentrieren abnimmt (Nielsen et al., 1999; Tian et al., 2004; Sands et al., 2006).

Als Folge eines Diabetes insipidus scheiden die betroffenen Patienten große Mengen stark verdünnten Urins aus (Sands et al., 2006).

Zentraler Diabetes insipidus

Beim zentralen Diabetes insipidus wird im Hypothalamus kein Vasopressin gebildet oder das gebildete Hormon ist funktionell unbrauchbar. Infolgedessen wird der Einbau von AQP2-Wasserkanälen in den Sammelrohren der Niere nicht stimuliert. Die Folge dieser Störung ist der Verlust der Fähigkeit den Harn zu konzentrieren. Dies führt zu Polyurie und Polydipsie (Robben et al., 2006).

Vasopressinüberexpression

Durch eine Überexpression von Vasopressin kommt es zu einem Überangebot an AQP2-Kanälen und infolgedessen zu einem gesteigerten Plasmavolumen und einem herabgesetzten Serumnatriumspiegel (Nielsen et al., 1999; Robben et al., 2006). Dies wiederum kann in Folge einer kongestiven Herzinsuffizienz, einer Leberzirrhose, einer Präeklampsie, aber auch durch neoplastische Veränderungen geschehen. Zudem können Medikamente wie Thiazide und SSRIs diesen Wirkmechanismus auslösen (Robben et al., 2006; Schrier, 2006; Xu et al., 1997). Die größte Gefahr einer vermehrten Ausschüttung von Vasopressin ist eine lebensbedrohliche Hyponatriämie (Robben et al., 2006).

AQP2-Spiegel in der Schwangerschaft

Vor allem im letzten Trimester einer Schwangerschaft kommt es physiologisch zu einer gesteigerten Wasserretention. Dies ist die Folge einer AQP2-Überexpression, die durch einen Anstieg an Vasopressin, aber möglicher Weise auch anderer Faktoren, verursacht wird (Ohara et al., 1998). Die vermehrte Bildung von AQP2 beginnt bereits zu Beginn der Schwangerschaft und nimmt im Laufe der Schwangerschaft zu. Dabei wird AQP2 vor allem im Bereich der inneren Medulla vermehrt exprimiert (Schrier, 2006). Die Folge der gesteigerten AQP2-Produktion ist eine vermehrte Wasserresorption in den Sammelrohren und dadurch wiederum eine Volumenüberladung in den Gefäßen, die zu Wassereinlagerungen im Gewebe führt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Instrumente

Gerät	Hersteller
Autoklav	112, KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Computer	Precision 690, Dell, Frankfurt am Main
Filtersets	
TRITC-Filter	Filter set 43, Zeiss, Jena Anregung 533-558 nm Emission 570-640 nm
Cy2-Filter	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Anregung 450-490 nm Emission 500-550 nm
Fluoreszenzlampe	X-Cite 120, EXFO Life Sciences & Industrial Division, Mississauga, Kanada
Grafikkarte	Quadro FX 4500, NVIDIA, Wurselen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Inkubationsschrank	Modell B6200, Heraeus, Hanau
Kühl- und Gefrierschränke	Santo Kühlschrank, AEG, Nürnberg Comfortplus Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen Ultra-low-freezer -85°C, New Brunswick Scientific

Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR 80, Heidolph, Schwabach MR 3001 K, Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena AxioStar 1122-100, Zeiss, Jena Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar
PCR-Geräte	Thermocycler, OmniGene, MWG, Ebersberg Primus 96, Peqlab, Erlangen Lightcycler, Roche, Mannheim
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA Transferpette® P10, P100, P250, P1000, Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Scantisch	Motorisierter Märzhäusertisch (MAC 5000 Controller), Ludl Electronic Products, München
Schüttler	SM25, Edmund Bühler, Hechingen
Spannungsquellen	LKB ECPS 3000/150, Pharmacia, Ratingen LKB GPS 200/400, Pharmacia, Ratingen Multidrive XL, Pharmacia, Ratingen

UV-Leuchttisch	Fluorescent Tables, Renner, Dannstadt
UV-Spektrometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech, Freiburg
Vakuumzentrifuge	Univapo 150 H UniEquip, Martinsried
Vortexgerät	REAX1, Heidolph, Schwabach Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York, USA
Waage	Analysenwaage H-20T, Mettler, Gießen Feinwaage P-1210, Mettler, Gießen Feinwaage W13, Mettler, Gießen
Wärmeblock	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte	HI 1220, Leica, Wetzlar
Wärmeschränk	Modell 300, Memmert, Schwabach
Wasserbad	Modell W13, Haake, Karlsruhe 1083, GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Labofuge 400, Heraeus, Hanau Zentrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg Zentrifuge 5417C, Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebeeinbettkassetten	Labonord, Mönchengladbach
Glaswaren	Schott, Mainz Roth, Karlsruhe
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
Light Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Liquid Blocker	Labonord, Mönchengladbach
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can, Greenwich, USA
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht Bioenzym Scientific, Hessisch Oldendorf
Präparatekästen	Roth, Karlsruhe
Reagiergefäße „Eppendorfcups“ 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubgefäße „Falcon Tubes“ 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Skalpellklingen	Feather, Köln

2.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
DNA-Längenstandard: 100bp DNA Ladder	New England, Biolabs, Frankfurt am Main
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamtetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel Mounting Medium	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Glycerin 87%	Merck, Darmstadt
GoTaq DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
H ₂ O ₂ 30%	Merck, Darmstadt
HCl 1N	Merck, Darmstadt
Heparin Liquemin [®] 25000 5ml Ampullen (5000 I.E./ml)	Roche, Mannheim
Horse Serum	Sigma, Deisenhofen

Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Ketamin 10%	CP-Pharma, Burgdorf
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/μl	Invitrogen, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
nuclease free water	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)15 Primer, 0,5μg/μl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Paraplast-Plus Paraffin	Sherwood, St. Louis, USA
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Phenylhydrazin Hydrochlorid, C ₆ H ₈ N ₂ x HCL	Sigma, Deisenhofen
QuantiTect TM SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Düsseldorf
RNasin Ribonuclease Inhibitor, 40 U/μl	Promega, Mannheim
Sevofluran SEVOrane®	Abbott, Wiesbaden
TRIZOL	GibcoBRL, Eggenstein

Xylazin 2%

Ratiopharm, Ulm

Xylol

Merck, Darmstadt

2.1.4 Puffer und Lösungen Immunhistochemie

HS/PBS/BSA (Blockierlösung):

PBS-Otto-Puffer

10% HS

1% BSA

H₂O₂-Methanol:

10% H₂O₂

90% Methanol

H₂O₂-Stammlösung:

Aqua dest.

20% H₂O₂

Methyl-Carnoy-Lösung (Fixierlösung):

60% Methanol

30% Chloroform

10% Eisessig

PBS/BSA-Waschpuffer:

PBS-Otto-Puffer

1% BSA

PBS-(Phosphate Buffered Saline)-Otto-Puffer, pH 7,5:

Lösung A:

10 mM K₂HPO₄ x 3 H₂O

140 mM NaCl

Lösung B:

10 mM KH₂PO₄

PBS-Paraformaldehyd (Fixierlösung für Perfusion):

PBS

4% Paraformaldehyd

Phenylhydrazinlösung:

PBS-Otto-Puffer

0,14mM Phenylhydrazin-Hydrochlorid

nach 10 min Inkubation Zugabe von 0,0006% H_2O_2

2.1.5 Puffer und Lösungen Molekularbiologie

6x Loading Dye

0,09% Bromphenolblau

0,09% Xylencyanol

60% Glycerol

60 mM EDTA

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid 50mg/ml

10x-TBE (Tris-Borat-EDTA) - Puffer

0,9 M Tris

0,9 M Borsäure

0,02M EDTA

DEPC-H₂O

1/1000 Vol. DEPC in H₂O bidest., schütteln, über Nacht geöffnet unter dem Abzug stehen lassen, dann autoklavieren

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers.net in gewünschter Nukleotidabfolge synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Zugabe von nukleasefreiem Wasser wurde eine Konzentration von 100pmol/μm eingestellt.

AQP2

sense: 5'-CTG GCT GTC AAT GCT CTC CAC-3

antisense: 5'-TTG TCA CTG CGG CGC TCA TC-3'

GAPDH

sense: 5'-ATG CCA TCA CTG CCA CCC AGA AG-3'

antisense: 5'-ACT TGG CAG GTT TCT CCA GGC GG-3'

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper:

	Verdünnung	Hersteller
Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG	1:10	Beckman Coulter Immunotech., Marseille, Frankreich
Goat-Anti-Aquaporin2-IgG (AQP2-C17)	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundäre Antikörper:

	Verdünnung	Hersteller
TRITC-Donkey-Anti-Mouse-IgG	1:400	Dianova, Hamburg
Cy 2-Donkey-Anti-Goat	1:400	Dianova, Hamburg

2.1.8 Software, Internetdienste und weitere Hilfsmittel

Diese Arbeit wurde mit *Microsoft Word 2003* geschrieben. Für die Erstellung der histologischen Bilder wurde das Programm *AxioVision Rel. 4.5* von der Firma Zeiss verwendet. Bearbeitet wurden die Bilder mit der Software *Adobe Photoshop 9.0* und der Grafiksoftware *ImageJ* (Wayne Rasband, NIH, USA). Zur Rekonstruktion der Nieren in 3-D diente *Amira 4.1 vizualisation software* (Mercury Computer Systems, Inc., USA). Die eingefügten Grafiken wurden mit Hilfe von *MS-Visio*, *Microsoft PowerPoint 2003* und *Adobe Photoshop 9.0* erstellt. Für die Erstellung der Diagramme wurden die Programme *Microsoft*

Excel 2003 und *GraphPad Prism3* benutzt. Zur Literaturrecherche wurde PubMed von NCBI (The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet.

2.2 Histologische Methoden

2.2.1 Haltung der Versuchstiere

Für die Rekonstruktion wurden Nieren von C57/Bl6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Rekonstruiert wurden embryonale Nieren am Tag 16, 17, 18 sowie eine Niere am dritten postpartalen Tag und ein Organ einer adulten Maus.

Die Tiere wurden artgerecht in einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Dabei hatten die Versuchstiere stets freien Zugang zu Futter und Wasser. Um das genaue Entwicklungsstadium der embryonalen Versuchstiere bestimmen zu können, wurden die Elterntiere terminlich verpaart. Jeweils ein Weibchen und ein Männchen wurden für 24 Stunden in einen Käfig zusammengesetzt. Der Zeitpunkt der Trennung der Mäuse wurde als Embryonaltag 1 determiniert.

2.2.2 Entnahme und Fixierung der Organe

Um embryonale Nieren zu gewinnen wurden die Muttertiere mit Sevofluran betäubt und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden den Embryonen die Nieren entnommen und zur Konservierung für mindestens 24 Stunden bei 4°C in Methyl-Carnoy-Lösung gelegt. Organe von postpartalen Tieren wurden nach Betäubung und Dekapitation herauspräpariert und in Methyl-Carnoy-Lösung fixiert.

Zur Präparation adulter Nieren wurden die Tiere zunächst mit 80 mg Ketamin und 16 mg Xylazin pro kg Körpergewicht i.p. narkotisiert. Daraufhin wurde nach einer Längslaparotomie die Aorta abdominalis unterhalb des Abgangs der Aa. renales abgeklemmt. Auf diese Weise wurde die renale Blutzufuhr nicht beeinträchtigt. Distal der Klemme wurde ein Perfusionskatheter eingeführt um die Nieren nach Öffnung der Klemme und Eröffnung der V. cava inferior zunächst mit 10 ml NaCl-Lösung und 10 I.E. Heparin retrograd zu perfundieren und anschließend mit 4% Paraformaldehyd in PBS mit einer Flussrate von 16 ml/min zu fixieren. Die V. cava inferior wurde zur Druckentlastung geöffnet.

2.2.3 Einbettung in Paraffin

Die entnommenen und fixierten Nieren wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet, um das Gewebe haltbar und schneidfest zu machen. Dazu wurden die Organe zuerst zwei mal 30 Minuten auf dem Schüttler in 70% Methanol eingelegt. Diese Schritte wurden mit 80% Methanol, 90% Methanol, 100% Methanol und Isopropanol wiederholt. Daraufhin wurden die Nieren 30 Minuten lang in 45°C warmem Isopropanol im Wärmeschrank inkubiert um das Gewebe an höhere Temperaturen zu adaptieren. Schließlich kamen die Organe für eine halbe Stunde in einen Topf mit 55°C warmem Gemisch aus Isopropanol und Paraffin im Verhältnis 1:1 bevor sie jeweils für mindestens 24 Stunden in 60°C heißes Paraffin 1 und Paraffin 2 gesetzt wurden. Dies entspricht dem Schmelzpunkt von Paraffin. Schließlich wurden die Nieren in Silikon-Kautschuk-Förmchen ausgegossen. Die Förmchen wurden bereits am Vortag mit Paraffin gefüllt, um Luftblasen in den Blöcken zu vermeiden. Die Paraffin-Blöcke wurden über Nacht bei 4° C ausgehärtet.

2.2.4 Anfertigung von Serienschnitten

Die ausgehärteten Paraffinblöcke wurden auf Holzklötze geschmolzen, um eine feste Unterlage zu erhalten, die in das Rotationsmikrotom eingespannt werden konnte. Anschließend wurde das gesamte Organ in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und auf superfrost plus Objektträger aufgezogen. Diese Schnitte wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 39°C getrocknet.

2.2.5 Entparaffinierung

Um die Schnitte färben zu können, musste zunächst das Paraffin entfernt werden. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten zweimal 15 Minuten lang in Xylol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für dreimal 5 Minuten in absoluten Isopropanol gegeben. Dann wurden sie zweimal 5 Minuten in absoluten Methanol gelegt. Bei diesem Prozess wurde das Paraffin nach und nach aufgelöst und nur das eingebettete Organ blieb zurück.

2.2.6 Immunhistochemie

Zur Färbung der einzelnen Schnitte wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewendet. Bei dieser Methode geht ein primärer Antikörper eine feste Bindung mit einem

bestimmten Protein auf dem Serienschnitt ein. An den Fc-Teil dieses gebundenen Antikörpers heftet sich wiederum ein sekundärer Antikörper. Die Bindungsstellen der Antikörper sind spezifisch. Die für diese Arbeit verwendeten sekundären Antikörper sind fluoreszenzmarkiert. Für die Darstellung des Glattmuskelaktins wurde hierbei das rotleuchtende Chromophor Rhodamin benutzt, AQP2 wurde mit Hilfe von Cy2 grün dargestellt. Das Prinzip der indirekten Immunhistochemie ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

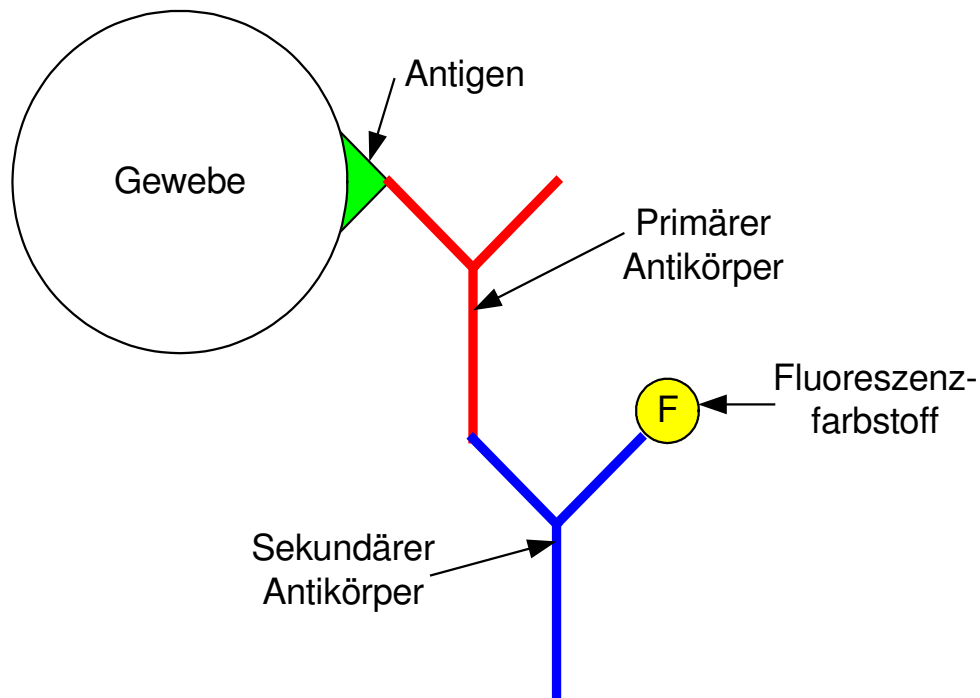


Abbildung 2.1: Antigen-Antikörper-Reaktion

Nach der Entparaffinierung wurde Embryonalgewebe in einer Blockierlösung aus 90% Methanol und 10% H_2O_2 auf dem Schüttler geschüttelt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Anschließend wurden die Schnitte dreimal für 5 Minuten auf dem Schüttler mit PBS-Otto gewaschen, trockengesaugt, mit einem Fettstift umrandet und für 20 Minuten mit 10%HS/1%BSA/PBS auf dem Schüttler zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen gewaschen. Nach dem Absaugen dieser Blockierlösung wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper wurden Mouse-Anti-Glattmuskelaktin-IgG in der Verdünnung 1:10 gegen Glattmuskelaktin und Goat-Anti-Aquaporin2-IgG als 1:200 Verdünnung gegen AQP2 verwendet. Die Verdünnungen wurden mit der Blockierlösung 10%HS/1%BSA/PBS angesetzt. Die so bearbeiteten Schnitte verblieben über Nacht bei 4°C im Kühlschrank.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten mit 1%BSA/PBS auf dem Schüttler gewaschen um den primären Antikörper, der nicht gebunden hatte, wegzuwaschen. Daraufhin konnte der sekundäre Antikörper auf die Schnitte pipettiert werden. Dieser verblieb für 2 Stunden im Dunkeln auf den Schnitten. Der sekundäre Antikörper musste stets vor Licht geschützt werden um seine fluoreszierenden Eigenschaften nicht zu zerstören. Als sekundäre Antikörper dienten TRITC-Donkey-anti-Mouse-IgG zur Darstellung des Glattmuskelaktins und Cy2-Donkey-anti-Goat zur Färbung von AQP2. Beide Antikörper wurden mit 1%BSA/PBS auf eine Konzentration von 1:400 verdünnt.

Nach 2 Stunden Inkubation bei RT wurde die Antikörperlösung abgesaugt. Die Schnitte wurden einmal 5 Minuten mit PBS-Otto gewaschen und anschließend 10 Minuten in Phenylhydrazin-PBS unter Schütteln im Wasserbad bei 37°C gewaschen um den Hintergrund zu klären. Anschließend wurde dieser Lösung eine H₂O₂-Stammlösung zugefügt. Die Endkonzentration in der Küvette betrug 0,0006% H₂O₂. Dieser Schritt diente ebenfalls dazu zu Klären und zu Blockieren. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal 5 Minuten in PBS-Otto auf dem Schüttler gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte mit Dako Glycergel als Mounting Medium und Deckgläsern eingedeckelt um sie zu konservieren. Auch in diesem Zustand ist der fluoreszierende sekundäre Antikörper lichtempfindlich und muss auch im weiteren Verlauf stets vor Licht geschützt werden.

2.3 Dreidimensionale Rekonstruktion

2.3.1 Mikroskopie und Fotografie

Die gefärbten Schnitte wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit motorisierter Objektauflage betrachtet und mit einer Schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) fotografiert und zwar in genau der Reihenfolge, in der das Organ vor dem Schneiden zusammengesetzt war. Die digitalisierten Bilder wurden mit der Software Axiovision Rel 4.5. von Zeiss bearbeitet.

Für alle Aufnahmen wurde eine 50fache Vergrößerung gewählt. Aktin wurde mit einem TRITC-Filter mit einer Anregungswellenlänge von 533-558 nm und einem Emissionsbereich von 570-640nm fotografiert. Für AQP2 wurde ein Cy2-Filter (Anregung: 450-490 nm, Emission: 500-550 nm) verwendet. Auf den so entstandenen Bildern leuchtete Aktin rot, wohingegen die Signale von AQP2 grün zu sehen waren. Alle Schnitte wurden mit der gleichen Belichtungszeit fotografiert um Signale in identischer Intensität zu erhalten. Wenn wegen der Größe der Niere mehr als ein Foto für einen Schnitt nötig war, wurden die Objekte

rasterartig fotografiert und mit dem Modus „stitching“ bearbeitet um eine 100prozentige Überlappung identischer Bildanteile zu gewährleisten. Zudem wurde ein Helligkeitsausgleich zwischen den einzelnen Kachelbildern vorgenommen. Die auf diese Weise entstanden Bilder wurden im Format zvi gespeichert.

Um die mit Axiovision erstellten Bilder mit der Grafiksoftware ImageJ bearbeiten zu können wurden die zvi-Dateien in das gängige Grafikformat TIFF überführt. Dies wurde mit der Option *Datei→Export* mit den Einstellungen *Mode:Kanäle, Kanalauswahl: Mischbilder erzeugen/Farbe verwenden/Nur Mischbilder, Dateityp: 8Bit/Anzeigewerte verwenden/TIFF* über den Befehl *Stapelverarbeitung/keinen Projektordner anlegen* erreicht.

2.3.2 Nachbearbeitung im Programm ImageJ

Von den im Programm AxioVision fotografierten Bildern wurde in ImageJ ein Stapel mit den Abmessungen des größten Bildes generiert. Dazu wurden mit *open* die gewünschten Bilder und ein Standard mit den Abmessungen des größten Bildes geladen. Dieser Standard wurde mit der Software *Adobe Photoshop* hergestellt. Bei der Bearbeitung der adulten Mausniere reichte der Arbeitsspeicher des Computers nicht aus. Aus diesem Grund wurden zunächst kleinere Stapel erstellt, die anschließend zu einem Gesamtstapel zusammengefügt wurden.

Nach dem Öffnen der Bilder wurden dem Computer die Befehle *Plugins→Stacks→Stackbuilder* erteilt. Nachdem auf diese Weise ein Stapel (Stack) aus den einzelnen Nierenschnitten in der Reihenfolge der ursprünglichen Organzusammensetzung entstanden war wurden die einzelnen Farbkanäle getrennt. Dies führte der Computer mit der Eingabe *Image→Color→RGB split* durch. Der „leere“ blaue Kanal wurde verworfen, wohingegen der Stapel mit dem roten bzw. mit dem grünen Kanal mit der Option *File→Save as→Image Sequence* gesichert wurde. Die Trennung der einzelnen Kanäle ist erforderlich damit später mit der Rekonstruktionssoftware Amira an Hand verschiedener Graustufen einzelner Pixel die Signale ausgewertet werden können.

2.3.3 Rekonstruktion der Nieren mit dem Programm Amira

Bounding Box

Zunächst musste in Amira 4.1 visualisation software der Bildstapel geöffnet und eine *Bounding Box* erstellt werden. Die *Bounding Box* ist der Raum, in dem die später rekonstruierte Niere liegt. Sie ist definiert durch die Pixel eines Bildes und die Anzahl und Schichtdicke der Schnitte. Das Verhältnis von Pixel zu μm ist abhängig von Objektiv und

Kamera. Bei dem verwendeten 5x Objektiv entspricht ein Pixel einer Abmessung von $2,01 \times 2,01 \mu\text{m}$. Im dreidimensionalen Raum spricht man nicht von Pixel sondern von Voxel. Demnach hat ein Voxel wegen der Fotografie mit dem 5x Objektiv und der Schnittdicke von $5 \mu\text{m}$ die Werte $2,01 \mu\text{m} \times 2,01 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$. Diese Werte wurden zur Erstellung der *Bounding Box* angegeben um eine korrekte Skalierung der Rekonstruktionen zu gewährleisten.

Alignierung

Durch Klick mit der rechten Maustaste konnten die Bilder über *Compute* \rightarrow *align slices* \rightarrow *edit* geöffnet werden. Der so entstandene Bildstapel befand sich zwar in der korrekten Reihenfolge der Bilder, die Schnitte waren aber unterschiedlich orientiert. Der nächste Schritt bestand darin die Bilder mit den Aktin-Signalen über Rotations- und Schiebebewegungen in Deckung zu bringen. Eine automatische Alignierung der Schnitte wäre zwar prinzipiell möglich gewesen, in der Realität entstehen aber durch die beim Schneiden wirkenden Scherkräfte gelegentlich sehr verzerrte Bilder, die per Hand richtig in das Gesamtorgan eingebracht werden müssen.

Anschließend wurde der Stapel mit den AQP2-Signalen geöffnet. Nach den Befehlen *Compute* \rightarrow *align slices* wurde der Stapel mit den sich bereits in der richtigen Orientierung befindenden Aktinbildern verbunden (Klick mit der rechten Maustaste auf den AQP2-Stapel \rightarrow *reference* \rightarrow Aktinstapel). Mit Hilfe der Option *resample* konnten die AQP2-markierten Bilder zu den Aktinbildern identisch orientiert werden. Auch diese Bilder wurden als orientierter Stapel gespeichert.

Datensegmentierung

Im Folgenden wurden beide Dateien getrennt geöffnet und mit *Labeling* \rightarrow *Labelfield* je eine Datei erstellt, in der alle Signale von Hand markiert werden konnten (Abbildung 2.2). Den Signalen der verschiedenen Strukturen musste dabei ein eigenes Material zugeordnet werden, um später eine Oberflächenberechnung zu ermöglichen.

Mit dem Tool *magic wand* wurden Voxel gleicher Helligkeit beim Klick auf ein Signal automatisch markiert. Für die Auswahl der zahlreichen AQP2-Signale, vor allem in Nieren höherer Entwicklungsstadien, erwies sich das Werkzeug *threshold* als große Hilfe. Mit diesem Tool werden ähnlich wie beim *magic wand* Voxel gleicher Graustufe markiert, in diesem Fall jedoch bezogen auf den kompletten Schnitt. Da dieses Werkzeug auch andere Strukturen als die gewünschten Signale erkannte, mussten die Label manuell korrigiert werden.

Dadurch, dass die Signale wie in vivo lagen, entstand an Hand der Aktinsignale eine dreidimensionale Darstellung des Gefäßsystems. Mit Hilfe der AQP2-Signale wurde der Verlauf der Sammelrohre nachvollziehbar. Zudem wurden in jeweils einem eigenen Labelfield die Nierenkapsel, sowie das Nierenbecken, der Ureter und einzelne Glomeruli rekonstruiert. Zu diesem Zweck wurde die Eigenfluoreszenz der genannten Strukturen ausgenutzt. Die Strukturen konnten mit Hilfe des *brush* frei Hand umfahren werden. Der Ureter konnte an Hand der Aktinsignale dargestellt werden, da er Glattmuskelaktin enthält. Mit Hilfe der Funktion *remove islands* konnten Artefakte entfernt werden.

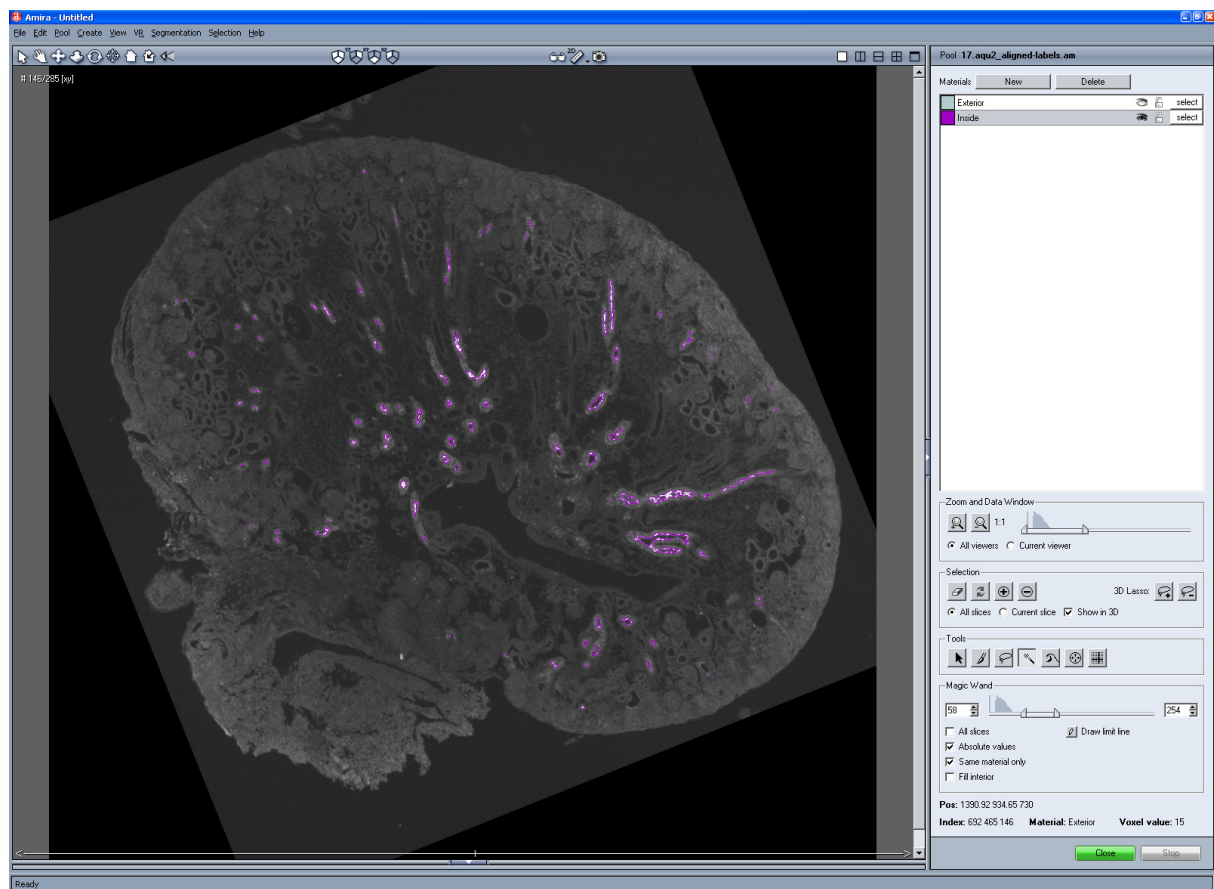


Abbildung 2.2: Datensegmentierung mittels Amira. Gezeigt sind AQP2- Signale im Entwicklungsstadium E17

Oberflächengenerierung

Als Grundlage für die Berechnung der 3-D-Modelle dienten die in der Datensegmentierung erstellten Materialien.

Zunächst mussten die Labeldateien in Amira angezeigt werden. Mit der Funktion *Surface Gen* wurde vom Computer eine dreidimensionale Darstellung der markierten Signale geschaffen. Diese konnte mit dem Befehl *Surface View* betrachtet werden. Die Darstellungen wurden vereinfacht, das bedeutet die Anzahl der Polygone aus denen ein 3-D-Model

zusammengesetzt ist wurde verringert. So konnte die Datenmenge reduziert werden ohne dass dabei zuviel wertvolle Detailinformationen verloren gingen. Eine für das Auge glattere Darstellung der Polygone wurde mit der Option *compute* → *smooth labels* geschaffen.

Die auf diese Weise entstandenen Modelle (Abbildung 2.3) können nun auf dem Bildschirm um ihre eigene Achse rotieren, wobei beliebig viele Strukturen dazugeschaltet werden können (Beispielsweise Kapsel + Aktin + Aquaporin2 + ...). Zudem ist es in dieser Ansicht möglich Strecken und Winkel zu messen sowie Volumen- und Flächenberechnungen durchzuführen.

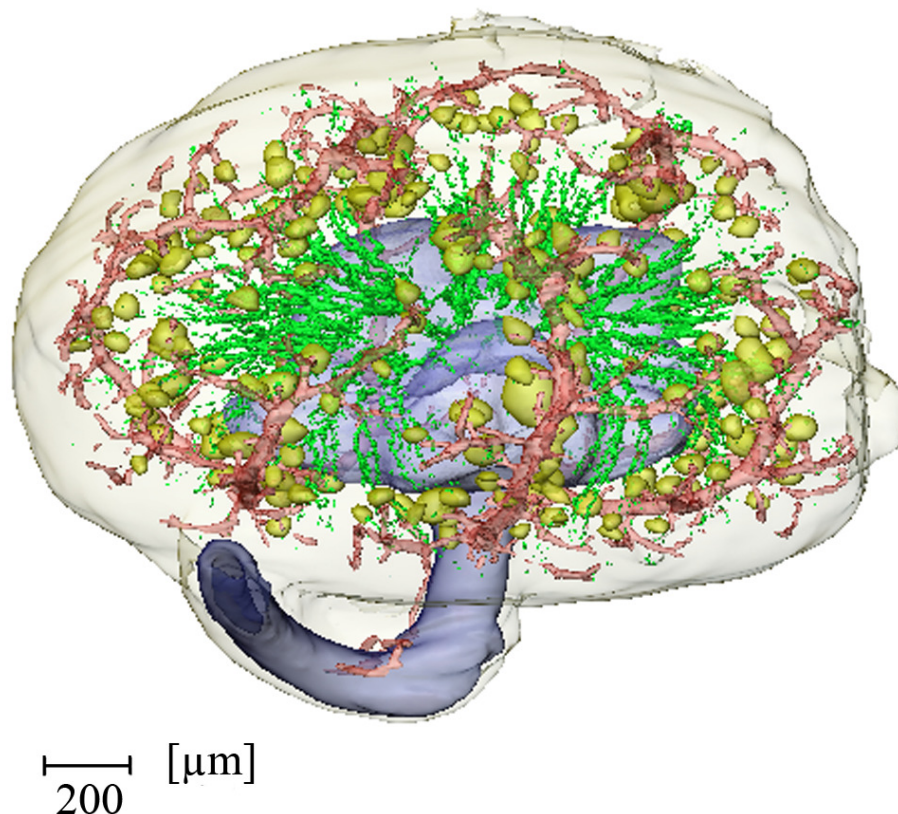


Abbildung 2.3: Oberfläche einer Niere im Entwicklungsstadium E18. In rot ist das Gefäßsystem dargestellt. Mit grün wurde AQP2 markiert. Nierenbecken und Ureter sind in blau dargestellt. Die Glomeruli sind gelb markiert.

2.3.4 Volumenberechnung

Volumenberechnungen werden vom Computer mit Hilfe des Labelfields getätigt. Mit einem Klick auf die rechte Maustaste können die Befehle *measure* → *tissue statistics* → *apply* → *show* erteilt werden. Der Computer berechnet bei dieser Funktion das Volumen der zuvor markierten Voxel. Der Wert *counts* entspricht bei dieser Berechnung den Voxeln. Ein Voxel sind $2,01 \times 2,01 \times 5 \mu\text{m}^3$.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Total-RNA aus gefrorenen Nieren basiert auf der Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987).

Alle Vorgänge wurden auf Eis ausgeführt. Um eine Kontamination durch RNasen zu vermeiden, wurden stets Latexhandschuhe getragen und RNase-freie Einmalartikel und Geräte verwendet. Glaswaren wurden durch dreistündiges Erhitzen auf 180°C RNase-frei gemacht, Benötigte Puffer und Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt.

Zunächst wurden die nach der Präparation eingefrorenen Organe mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1ml TRIZOL homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Zum Homogenat wurden 200µl Chloroform hinzugefügt. Das Gemisch wurde 15s stark geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei RT und folgender Zentrifugation (4°C, 12000g 15min) der Proben konnten drei Phasen separiert werden. Die obere, wässrige, RNA-haltige Phase wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde das gleiche Volumen 100% Isopropanol zugegeben, die Ansätze 10x geschwenkt und 10min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 12000g wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets mit 75%iger Ethanollösung gewaschen. Dazu wurde 1ml 75% Ethanol verwendet. Nach 5 min Zentrifugation bei 4°C und 7500g wurde der Überstand abgesaugt, die Pellets in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Zur vollständigen Lösung der RNA wurden die Pellets 1-3 min bei 55°C inkubiert. Die isolierte RNA wurde 1:50 mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und photometrisch vermessen, um deren Konzentration und Qualität zu bestimmen. Eine A260/A280 - Ratio von 1,6-2,0 wurde als qualitativ gut beurteilt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die isolierte RNA wurde zunächst mittels reverser Transkription in cDNA übersetzt. Um selektiv die mRNA-Moleküle, die ca. 2-4% der Gesamt-RNA ausmachen, umzuschreiben, wurden Oligo(dT)15 Primer verwendet, die mit dem 3'-Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNA hybridisieren. Die erhaltene cDNA diente als Template für die spätere quantitative PCR.

Ausgegangen wurde von 1µg Gesamt-RNA, die mit 0,5µg/µl Oligo-(dT)15 Primer gemischt und für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt wurde. Zu dem Reaktionsgemisch (20µl) wurden zusätzlich 100U M-MLV Reverse Transkriptase, 4µl 2,5mM je dNTP und 4µl 5x First Strand Buffer zugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte 1h bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren wurde der Reaktionsansatz anschließend 2 min auf 94°C erhitzt. Für die quantitative PCR wurde die erhaltene cDNA mit nuklease-freiem Wasser 1:3 verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.4.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)

Bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion (PCR) wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus photometrisch bestimmt. Dies ermöglicht den exponentiellen Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real time) zu verfolgen. Die Bestimmung der Produktmenge erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, der mit hoher Affinität in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet, wobei gebundenes SYBR Green 1000-fach stärker fluoresziert als freies und eine Signalintensität aufweist, die proportional zur entstehenden DNA-Menge ist. Die PCR wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit an einem Light-Cycler durchgeführt. Der 20µl-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus 10µl QuantiTect™ SYBR® Green PCR Mastermix, je 1µl sense und antisense Primer (10pmol/µl), 6µl RNase-freies H₂O und 2µl cDNA. Das Amplifikationsprotokoll bestand, nach der Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase von 15min bei 95°C, aus 40 Zyklen mit 15s Denaturierungsphase bei 95°C, 20s Annealingphase bei 58°C und 20s Elongationsphase bei 72°C. Nach jedem Zyklus erfolgte die Fluoreszenzmessung. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1°C/s) von 60°C auf 95°C erhitzt und dabei die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen. Als Housekeeper diente GAPDH. Der AQP2-mRNA Gehalt pro Niere wurde berechnet aus der Gesamtausbeute an extrahierter RNA und des AQP2-mRNA Levels. So konnten alle AQP2-mRNA Levels in der sich entwickelnden Niere relativ zu den Levels in der adulten Niere verglichen werden.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die dreidimensionale AQP2-Expression in der Entwicklung der Mausniere dargestellt. AQP2 ist ein Markerprotein für die Hauptzellen der Sammelrohre. Mit seiner Hilfe konnte das dreidimensionale Verteilungsmuster der Sammelrohre und die Entwicklung dieses Systems am Mausmodell dargestellt werden. Mit einer Cofärbung gegen Glattmuskelaktin wurde das arterielle Gefäßsystem als Maß für den Entwicklungsstand der Niere dargestellt. Des Weiteren wurde die intrazelluläre Verteilung von AQP2 untersucht.

3.1 Entwicklung des arteriellen Gefäßbaums

Arterielle Signale wurden mit Hilfe einer Immunfluoreszenz-Färbung gegen Glattmuskelaktin sichtbar gemacht. Die Nierenkapsel besitzt Eigenfluoreszenz. Mit Hilfe der Rekonstruktionssoftware Amira wurden die Signale auf zweidimensionalen Paraffinschnitten dreidimensional angeordnet. Dadurch kann die Größenzunahme der Nieren sowie das Verzweigungsmuster des arteriellen Gefäßbaums in einer dreidimensionalen Optik verfolgt werden. Der arterielle Gefäßbaum gibt Aufschluss über den Entwicklungsstand der Niere. Exemplarisch sind die Entwicklungsstadien E16, E17, E18, pp3 und adult aufgeführt (Abbildung 3.1). Die Stadien E16, E17 und E18 wurden komplett rekonstruiert. Im Entwicklungsstadium pp3 ist eine halbe Niere gezeigt. Bei der adulten Niere ist ein Querschnitt von 198 Schnitten à 5 µm aus der Mitte des Organs rekonstruiert. Die Rekonstruktionen stehen im korrekten Größenverhältnis zueinander.

Wie aus den abgebildeten Modellen ersichtlich ist, findet eine stetige Größenzunahme der Nieren statt. Der arterielle Gefäßbaum wird im Laufe der Entwicklung immer komplexer. Ausgehend von der A. renalis verzweigt sich das Gefäßsystem über Aa. interlobares in arcuate Arterien, von denen wiederum arcuate Seitenäste aussprossen.

Am Embryonaltag 16 ist das arterielle System bis zu den arcuaten Seitenästen ausgebildet. An diesen Seitenästen finden in den folgenden Entwicklungstagen Ausknospungen statt. Auf diese Weise wird der arterielle Gefäßbaum zunehmend verzweigter.

In der Mitte der Organe bleibt stets eine Aussparung für das Nierenbecken und die Papille frei. Hier wachsen zu keinem Entwicklungsstand größere Gefäße ein.

Abbildung 3.1 zeigt, dass die rekonstruierten Nieren E17 und E18 in ihrem Entwicklungsstand nahezu identisch sind.

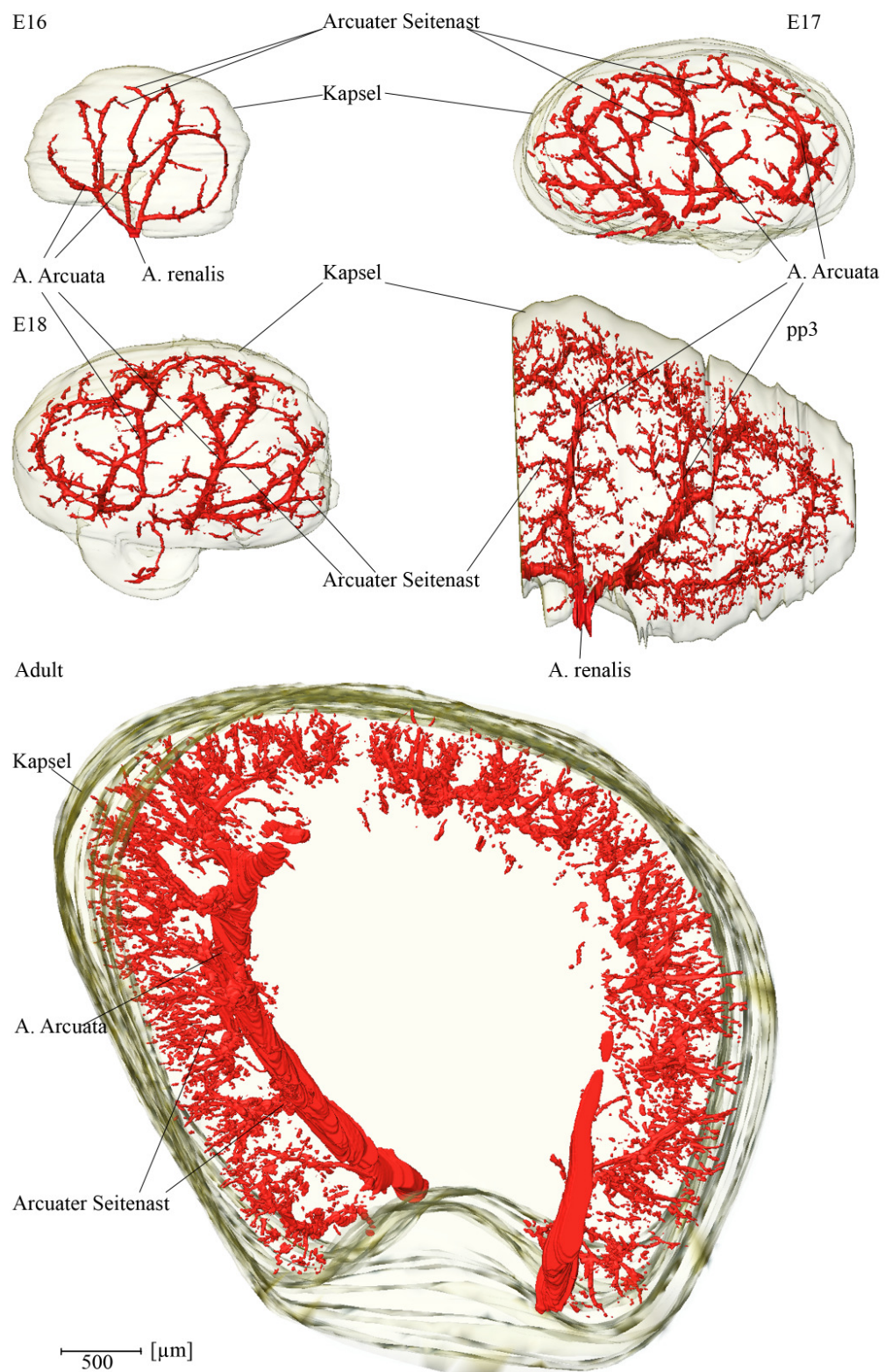


Abbildung 3.1: Überblick über die 3-D-Rekonstruktion des arteriellen Gefäßsystems

3.2 Signalverteilung des Kanalproteins Aquaporin2

Auf den folgenden Seiten sind Rekonstruktionen der Nieren E16, E17 und E18 sowie ein 1mm dicker Querschnitt durch die Nieren pp3 und adult gezeigt.

Die Nierenkapsel (transparent), einzelne Glomeruli (gelb) und das Nierenbecken (blau) wurden mit Hilfe ihrer Eigenfluoreszenz dargestellt. Weil der Ureter (blau) Glattmuskelaktin enthält, wurde er bei der Immunfluoreszenzfärbung der Gefäße (rot) ebenfalls markiert. Die Hauptzellen der Sammelrohre wurden mit einer Färbung gegen AQP2 (grün) dargestellt.

Auf die Expression von AQP2 sowie auf den Verlauf und die räumliche Verteilung der Sammelrohre wird anschließend näher eingegangen.

E16

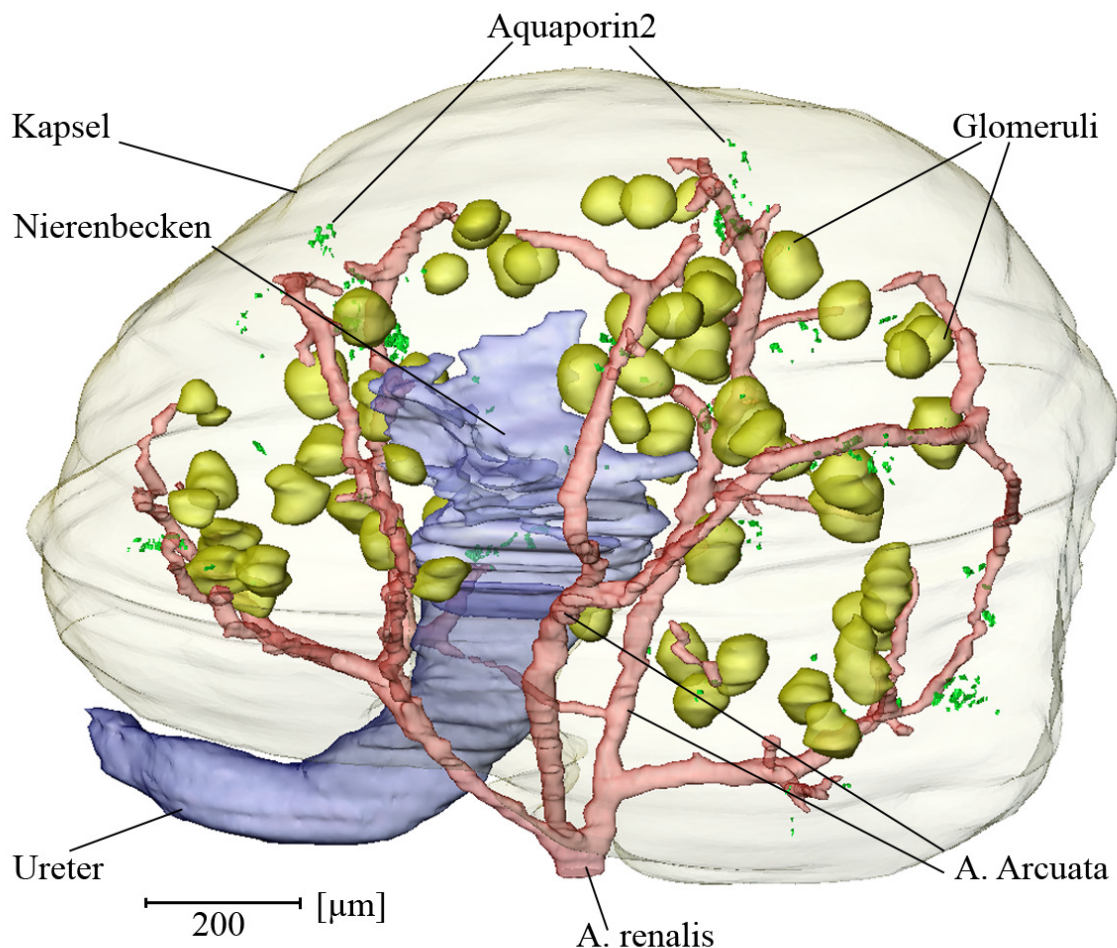


Abbildung 3.2: 3-D-Rekonstruktion einer Niere im Entwicklungsstadium E16. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.

E17

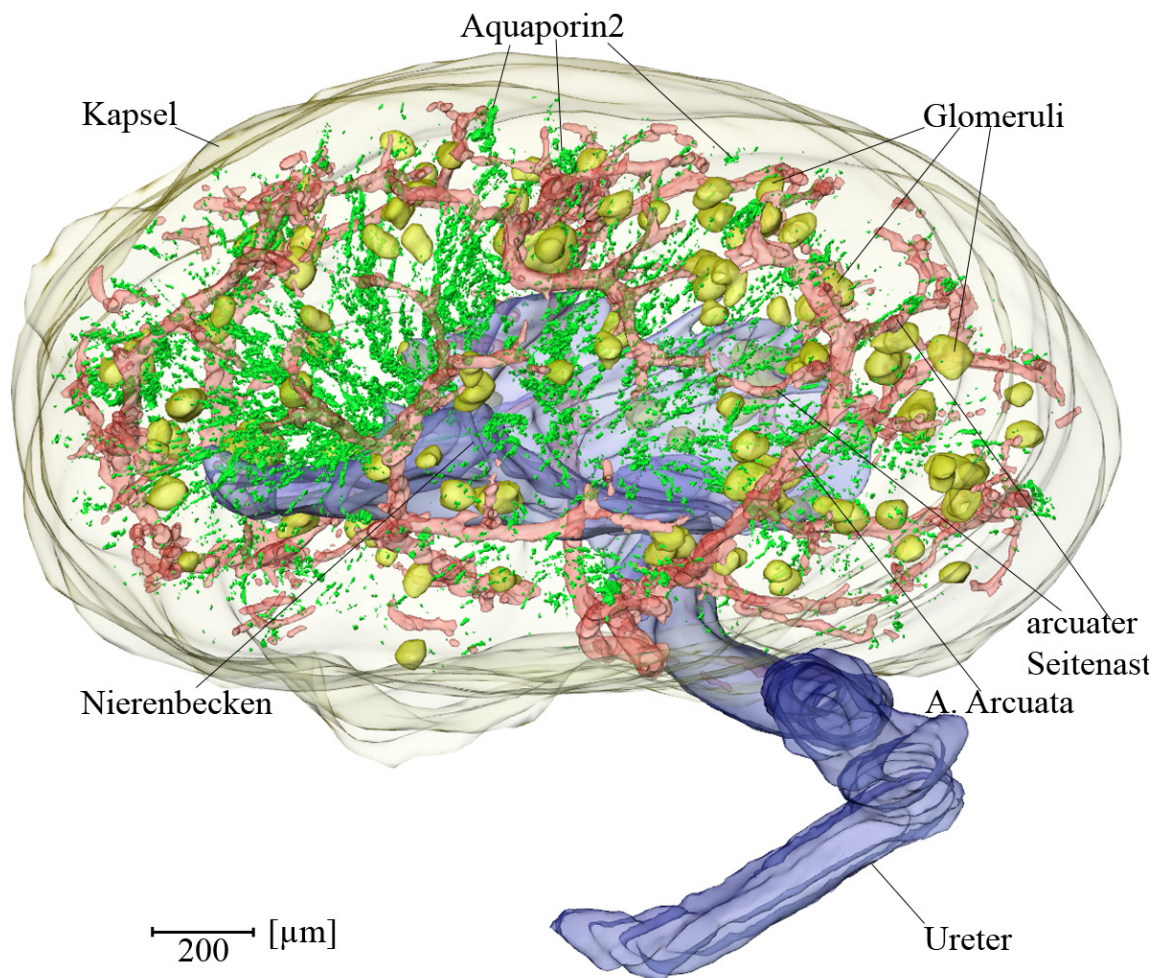


Abbildung 3.3: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag E17. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.

E18

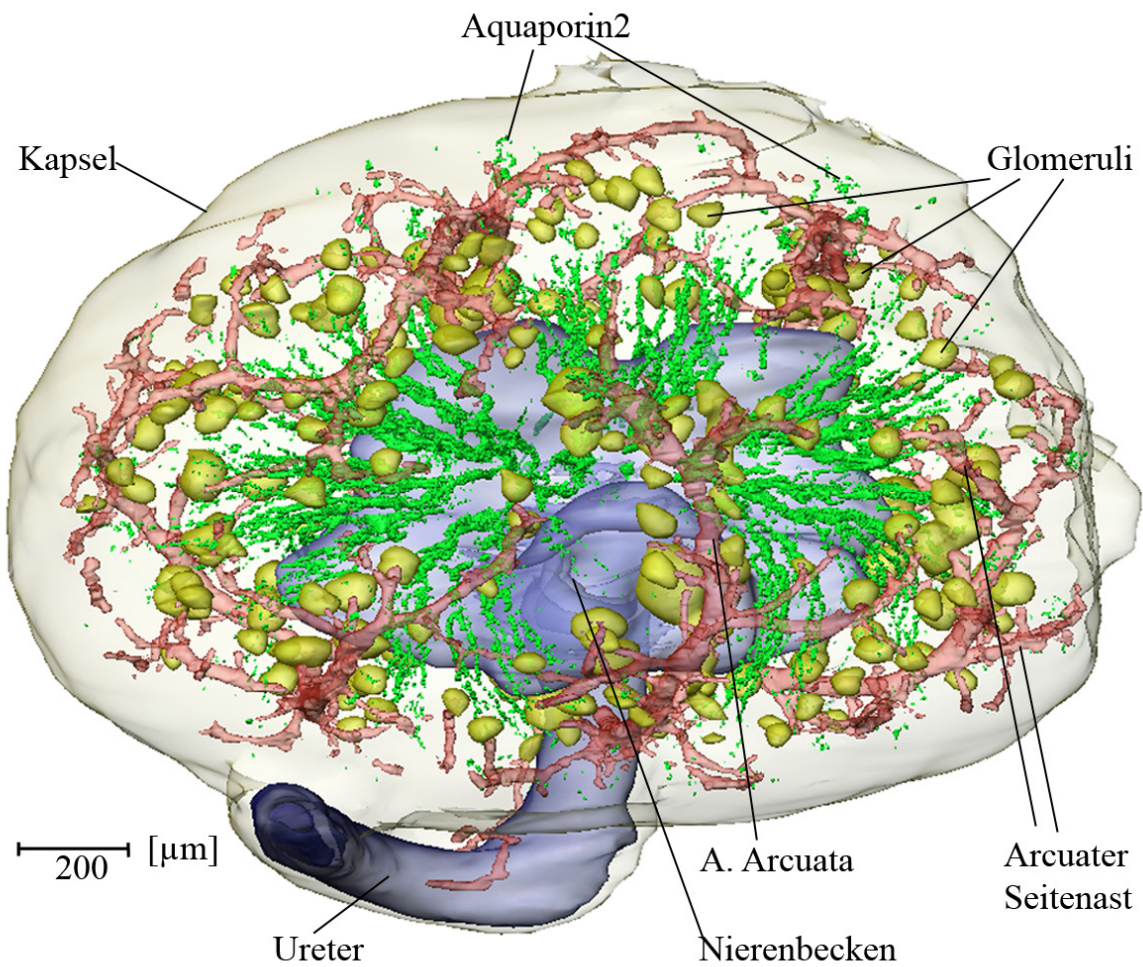


Abbildung 3.4: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag E18. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.

pp3

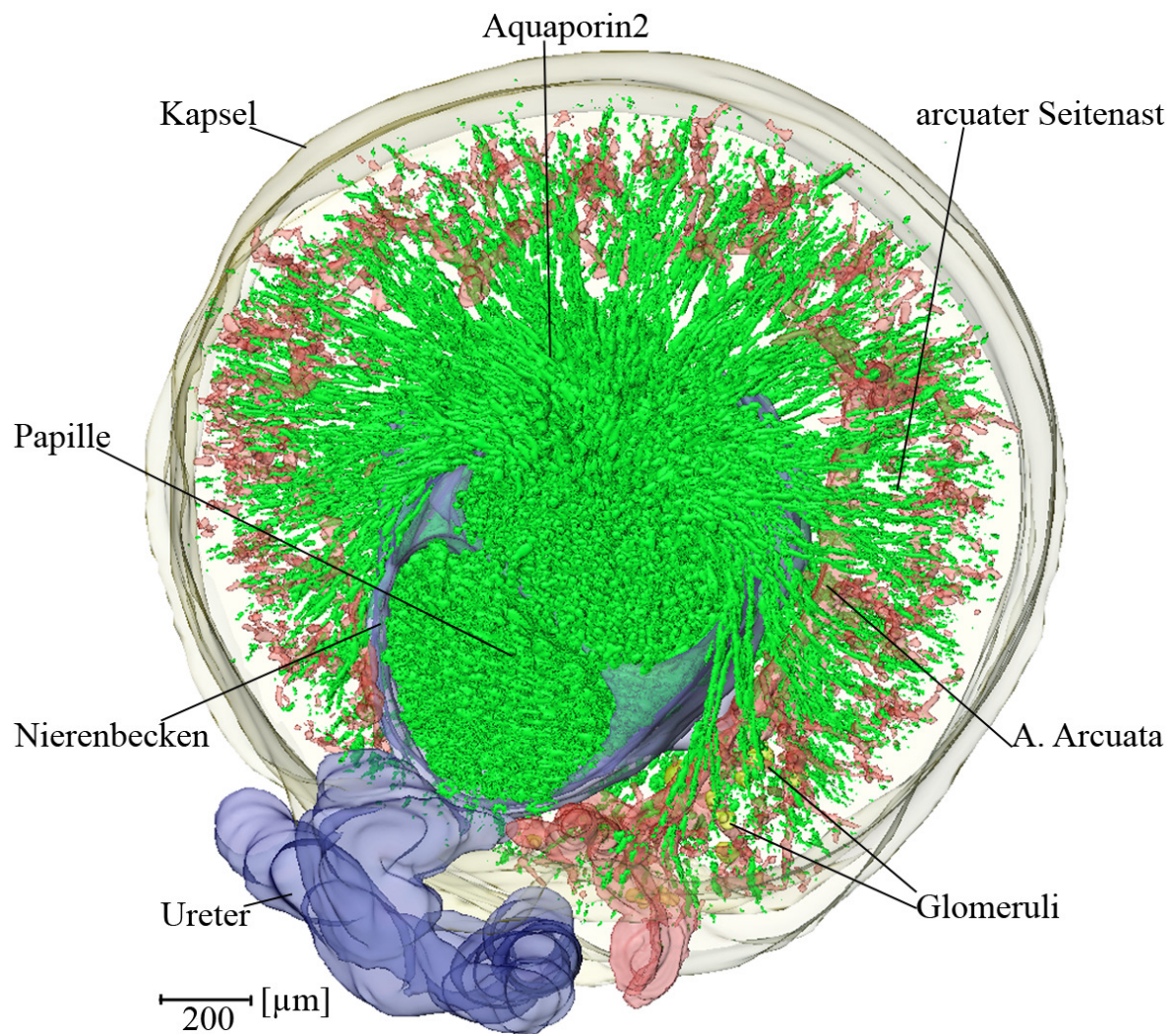


Abbildung 3.5: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag pp3. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.

Adult

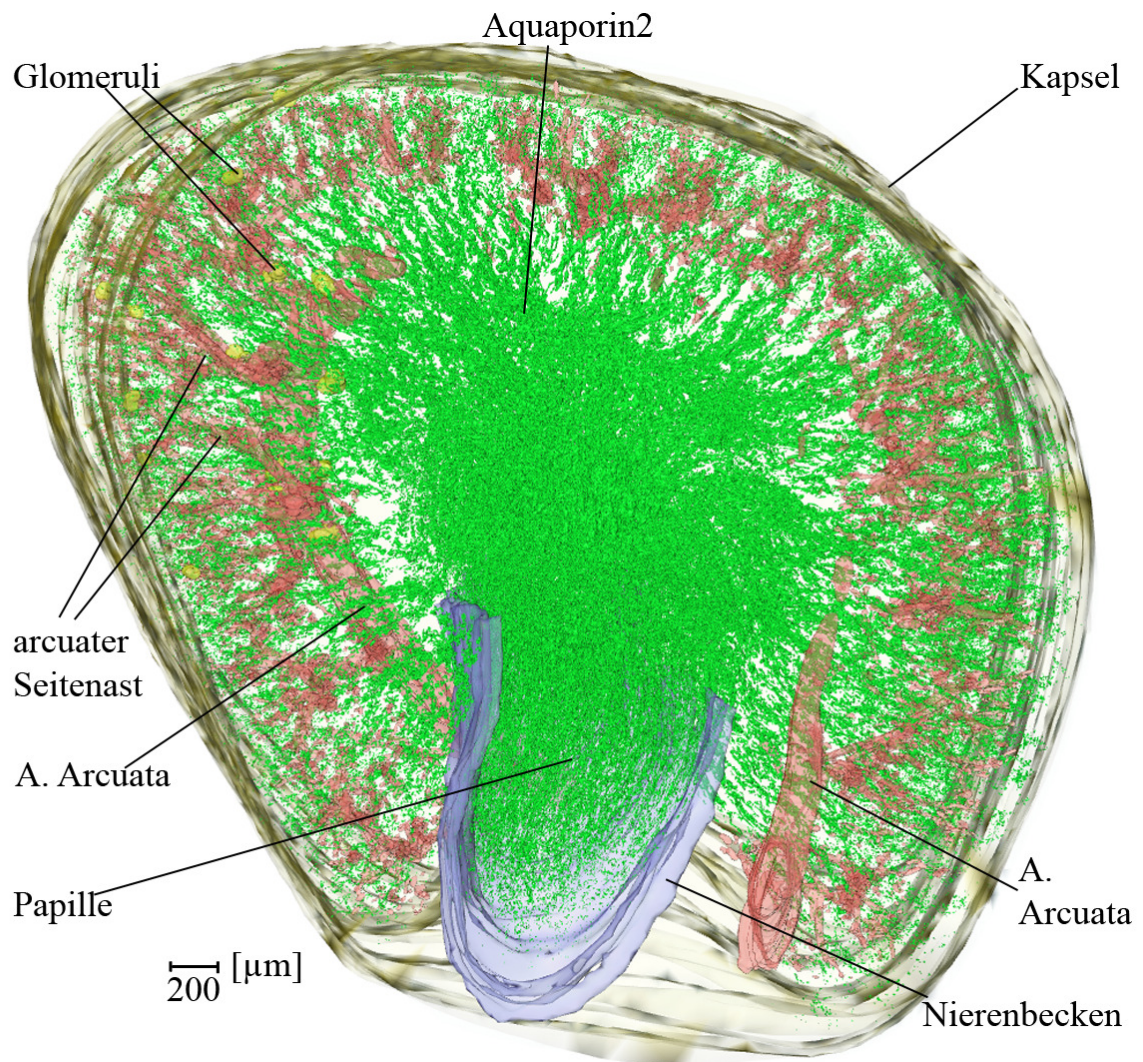


Abbildung 3.6: 3-D-Rekonstruktion einer Niere im Adultzustand. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.

Die Modelle (Abbildung 3.2 - Abbildung 3.6) zeigen, dass sich das Gefäßsystem zunehmend verzweigt. Die Expression von AQP2 nimmt zu. Zahlenmäßig sind immer mehr Sammelrohre zu erkennen. Des Weiteren steigt die Zahl der Glomeruli an. In den Stadien E16, E17 und E18 sind nahezu alle Glomeruli rekonstruiert. Bei der drei Tage alten und bei der adulten Niere wurden wegen der großen Zahl der bereits gebildeten Glomeruli nur exemplarisch einzelne Nierenkörperchen herausgegriffen. Gemäß dem Wachstum des gesamten Organs, nimmt das Nierenbecken im Laufe der Entwicklung an Größe zu. Die Papille gewinnt an Länge.

Um die räumliche Distribution von AQP2 innerhalb der Niere besser beurteilen zu können, sind im folgenden Abschnitt Modelle gezeigt, in denen AQP2, die Nierenkapsel, das Nierenbecken und der Ureter dargestellt sind.

E16

In Abbildung 3.7 sind die AQP2-Signale am Embryonaltag 16 dargestellt. Zur besseren Orientierung im dreidimensionalen Raum wurden die Kapsel, das Nierenbecken und der Ureter mit rekonstruiert.

Am Embryonaltag 16 wird AQP2 punktuell exprimiert. Die Signale sind vor allem im Kortex und in der äußeren Medulla lokalisiert. Dabei fällt eine ungleichmäßige, gruppenweise angeordnete Verteilung auf. Die histologischen Schnitte zeigen, dass dieses Muster durch eine Ansammlung einzelner AQP2-Signale in Anschnitten großlumiger Sammelrohre entsteht (Abbildung 3.8).

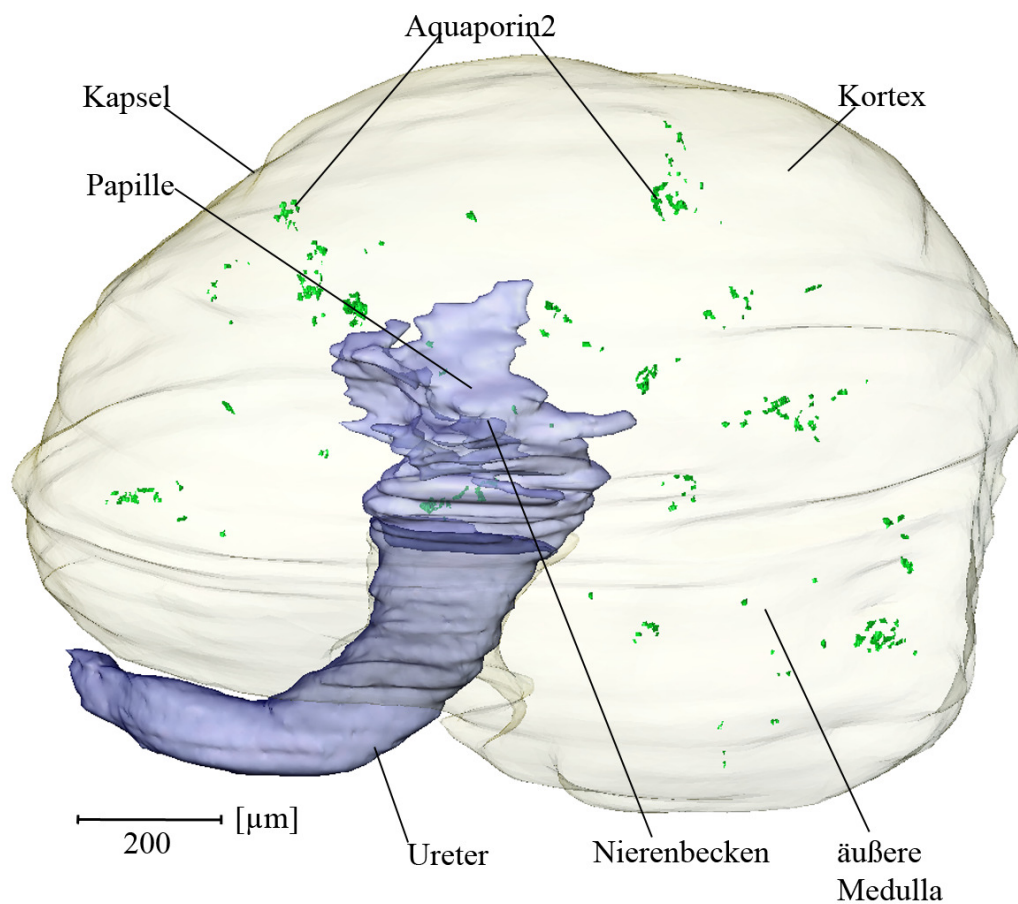
E16 (Frontalansicht)

Abbildung 3.7: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E16. Kapsel (transparent), Nierenbecken (blau), Ureter (blau).

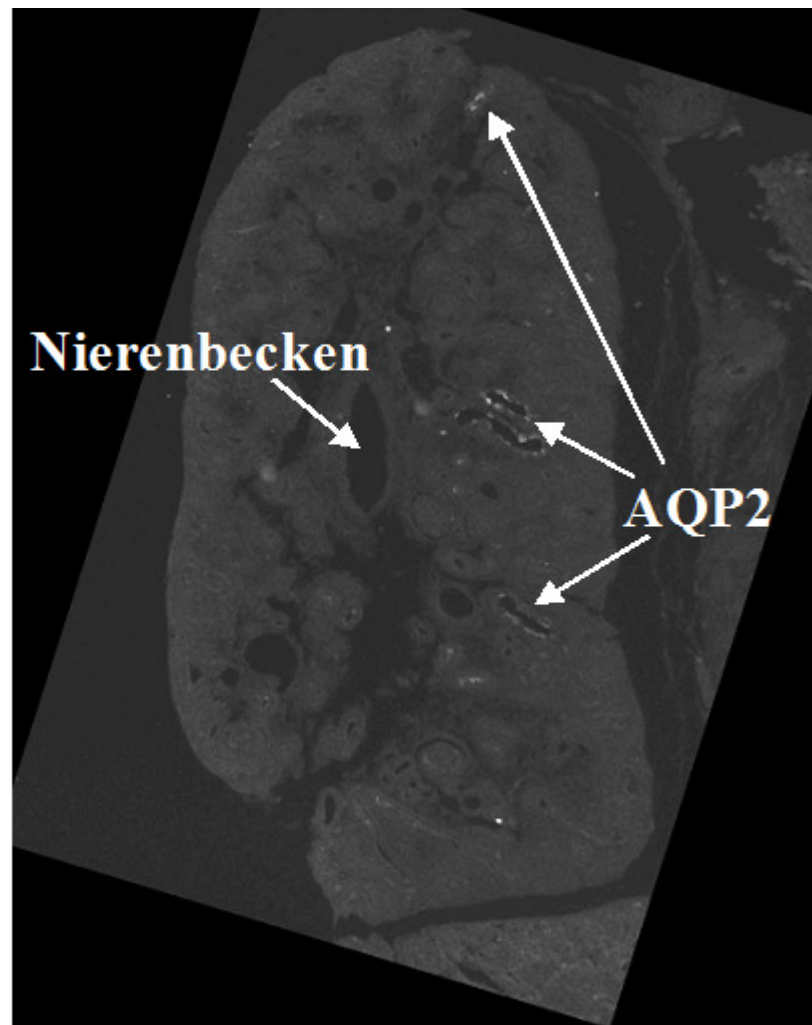


Abbildung 3.8: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E16. AQP2-Signale finden sich vor allem in Anschnitten größerer Sammelrohre.

E17, E18

Bis zum Embryonaltag 17 und 18 nimmt die Zahl der AQP2-Signale kontinuierlich zu. Es steigt sowohl die Anzahl der Sammelrohre, als auch die Signalmenge im einzelnen Sammelrohr. Da ausschließlich die Hauptzellen der Sammelrohre AQP2 exprimieren, die Zwischenzellen AQP2-frei sind, wirken die Sammelrohre diskontinuierlich. Die Sammelrohre liegen im Bereich der Papille dichter aneinander, da alle Sammelrohre ausschließlich über die Papille in das Nierenbecken münden. Das Areal direkt unterhalb der Kapsel ist AQP2-frei (Abbildung 3.9, Abbildung 3.10).

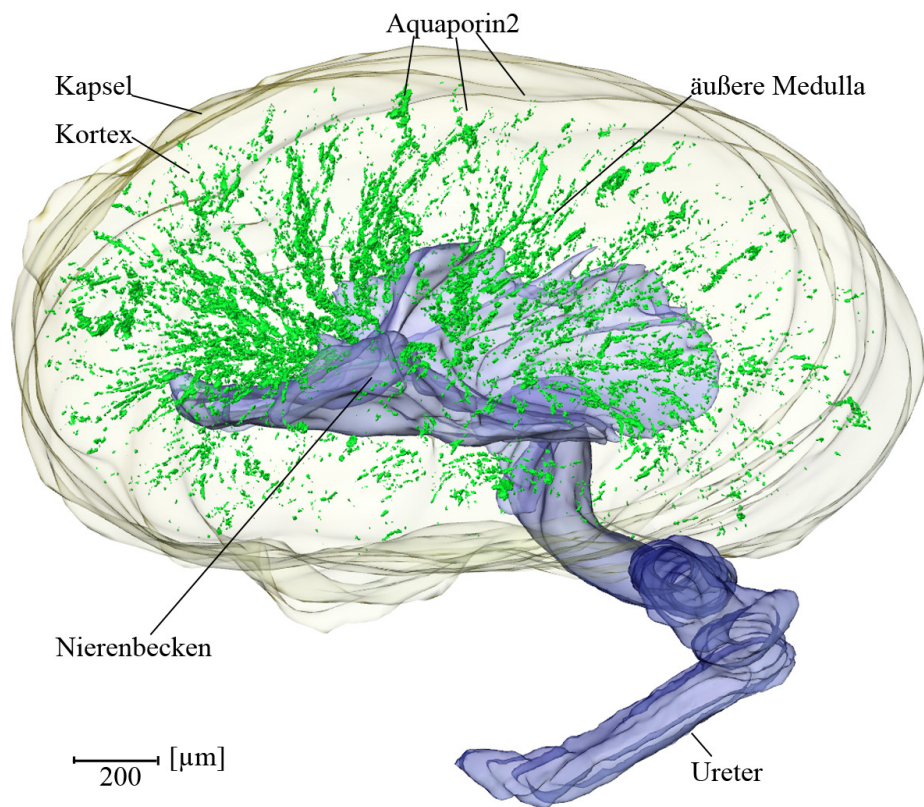
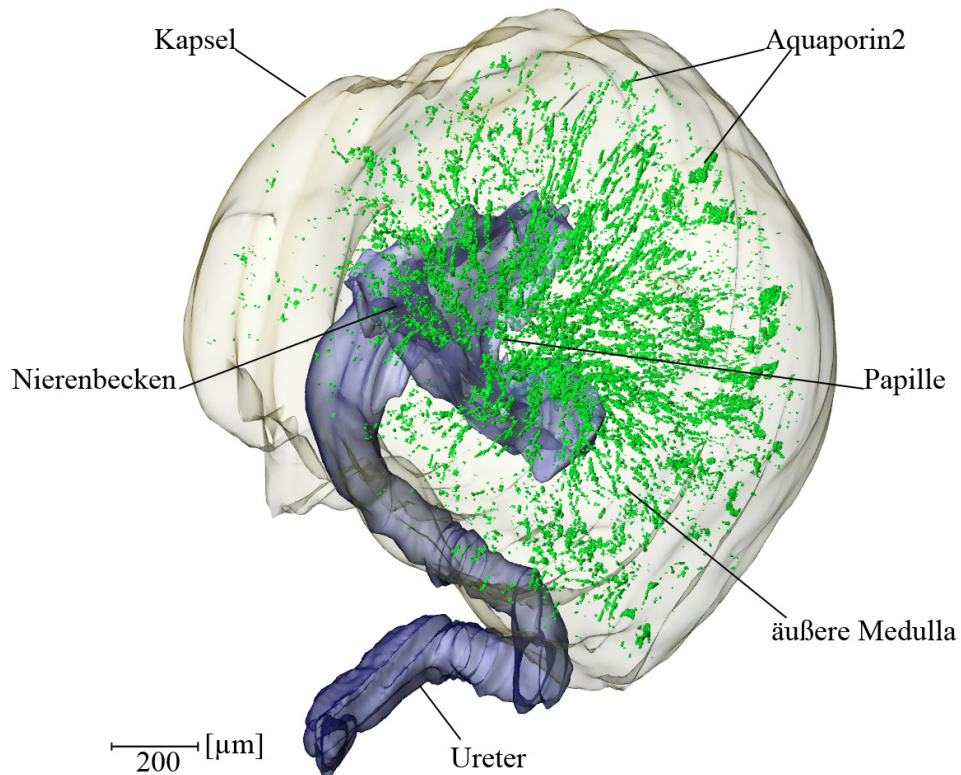
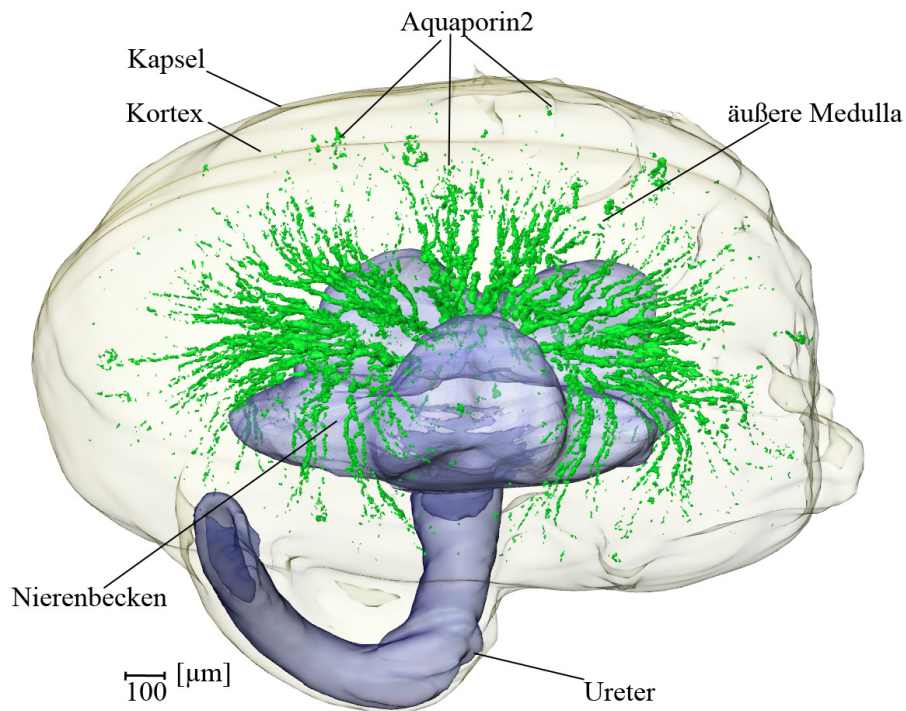
E17 (Frontalansicht)**E17 (Sagitalansicht)**

Abbildung 3.9: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E17. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau).

E18 (Frontalansicht)



E18 (Sagitalansicht)

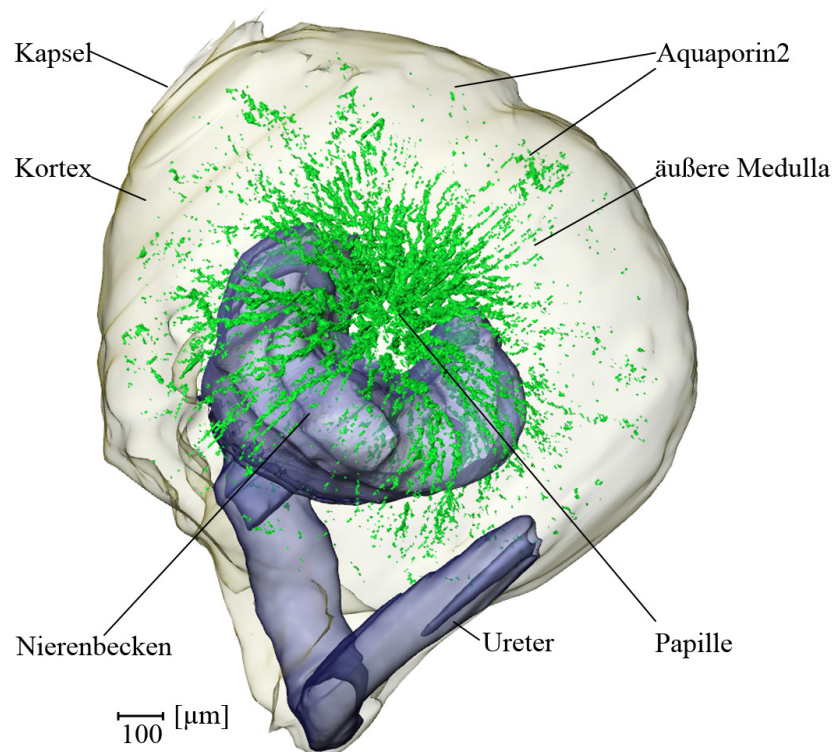


Abbildung 3.10: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E18. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau).

In der Histologie können mit Hilfe der Signale gegen AQP2 Verzweigungen im Bereich der Papille und der inneren Medulla gesehen werden. In der äußeren Medulla und im Kortex verlaufen die Sammelrohre gerade ohne Aufzweigungen (Abbildung 3.11). Die Histologie zeigt auch, dass die kleineren Sammelrohre im Bereich des Kortex in Gruppen zu zwei bzw. drei Sammelrohren angeordnet sind (Abbildung 3.12).

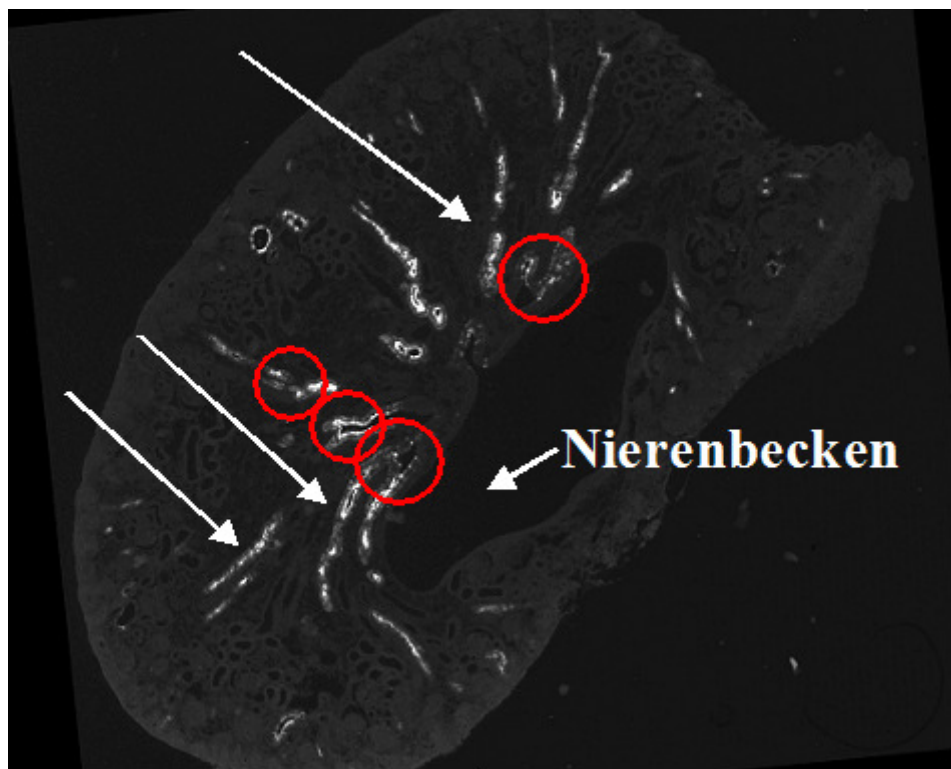


Abbildung 3.11: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E18. AQP2 (weiß) markiert die Hauptzellen der Sammelrohre. Die Sammelrohre teilen sich im Bereich der Papille und der inneren Medulla (rote Kreise) und verlaufen im Kortex und der äußeren Medulla über längere Strecken gerade (weiße Pfeile).

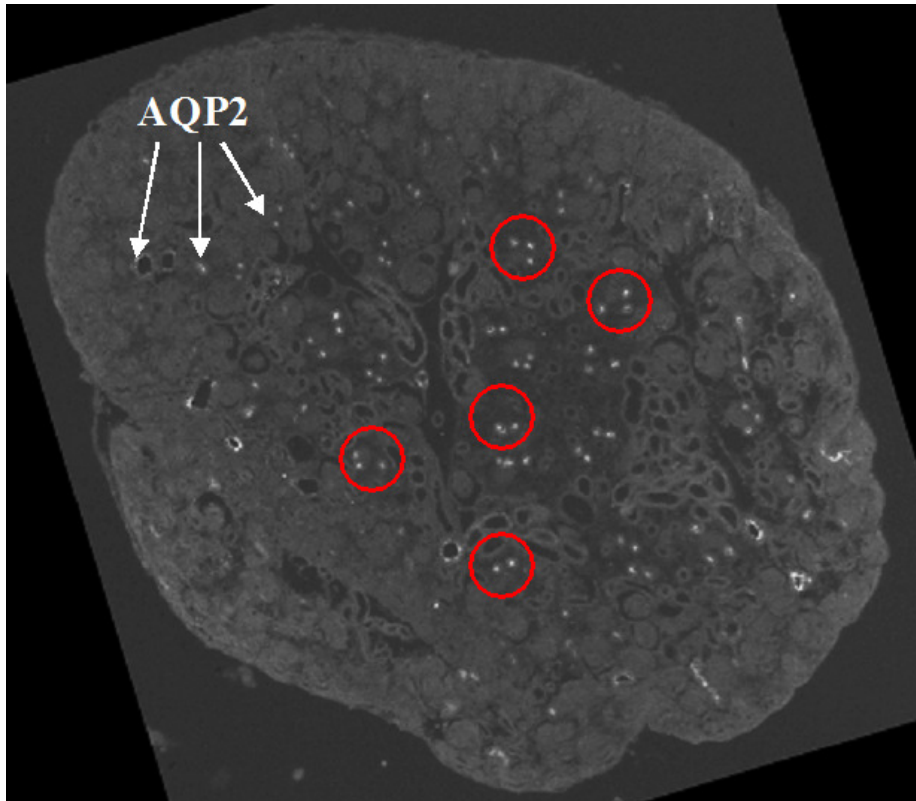


Abbildung 3.12: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E17. AQP2 (weiß) markiert die Hauptzellen der Sammelrohre. An Hand roter Kreise ist die Anordnung kleiner Sammelrohre des Kortex in Gruppen zu zwei bzw. drei Sammelrohren hervorgehoben.

pp3

Obwohl nur ein Ausschnitt von 200 Querschnitten à 5µm aus der Mitte des Organs gezeigt ist (Abbildung 3.13), ist die Überlagerung der einzelnen Signale vor allem im Bereich der Papille so groß, dass einzelne Signale schwer getrennt wahrgenommen werden können. Im Bereich der Papille wird so viel AQP2 exprimiert, dass einzelne Sammelrohre kaum mehr von einander unterschieden werden können. Im Vergleich zu den unreiferen Stadien E17 und E18 nimmt die Zahl der Sammelrohre zu. AQP2 wird zunehmend auch in Kapselnähe gebildet.

pp3 (Querschnitt)

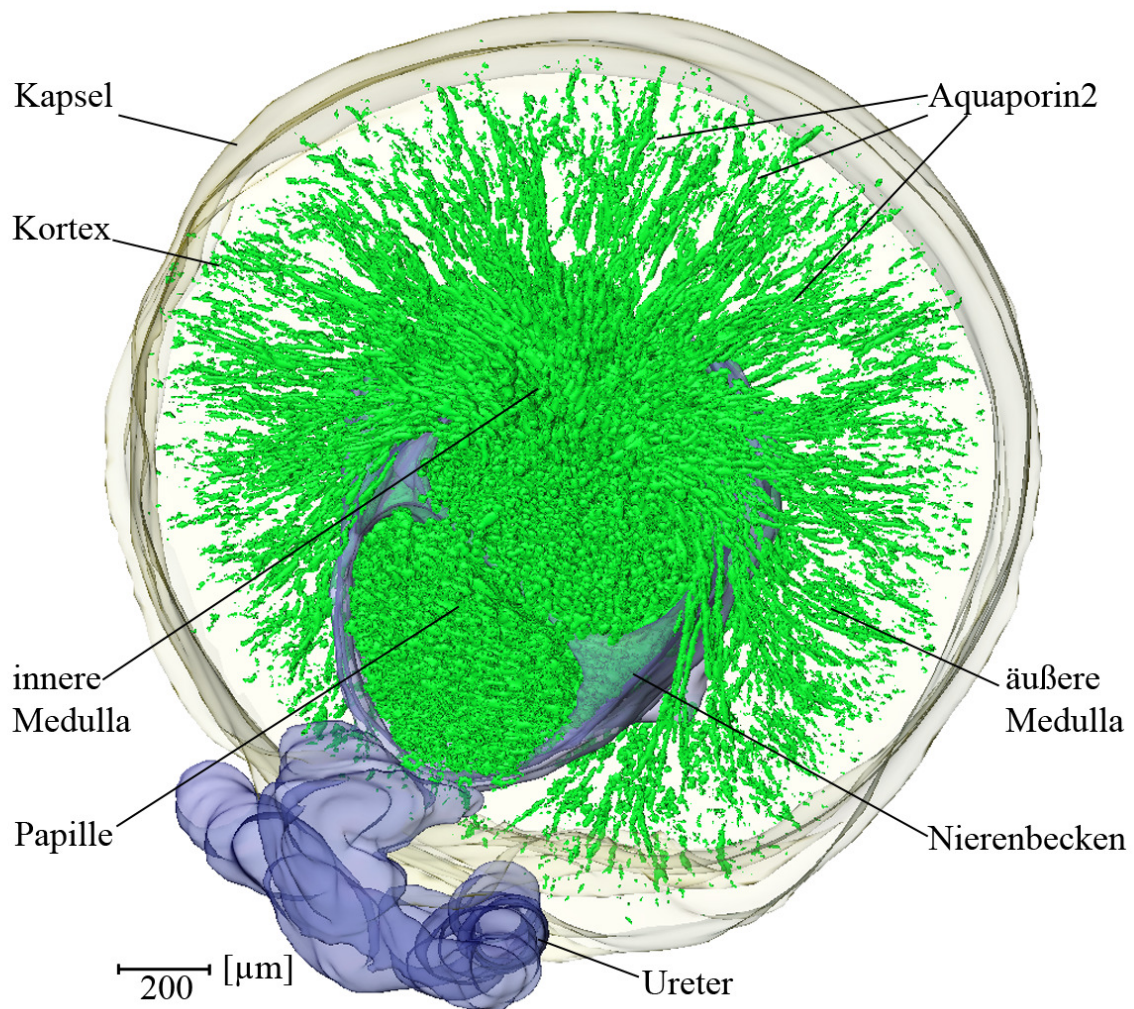


Abbildung 3.13: Aquaporin2 (grün) drei Tage nach der Geburt. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau). Ausschnitt zusammengesetzt aus 200 Querschnitten à 5 µm aus der Mitte des Organs.

In der Histologie (Abbildung 3.14) sind Verzweigungen zu erkennen. Der Verlauf der Sammelrohre von peripher nach zentral über die Papille in das Nierenbecken ist deutlich zu sehen. Auch postpartal kann eine Gruppierung von kleinen kortikalen Sammelrohren festgestellt werden (Abbildung 3.15).

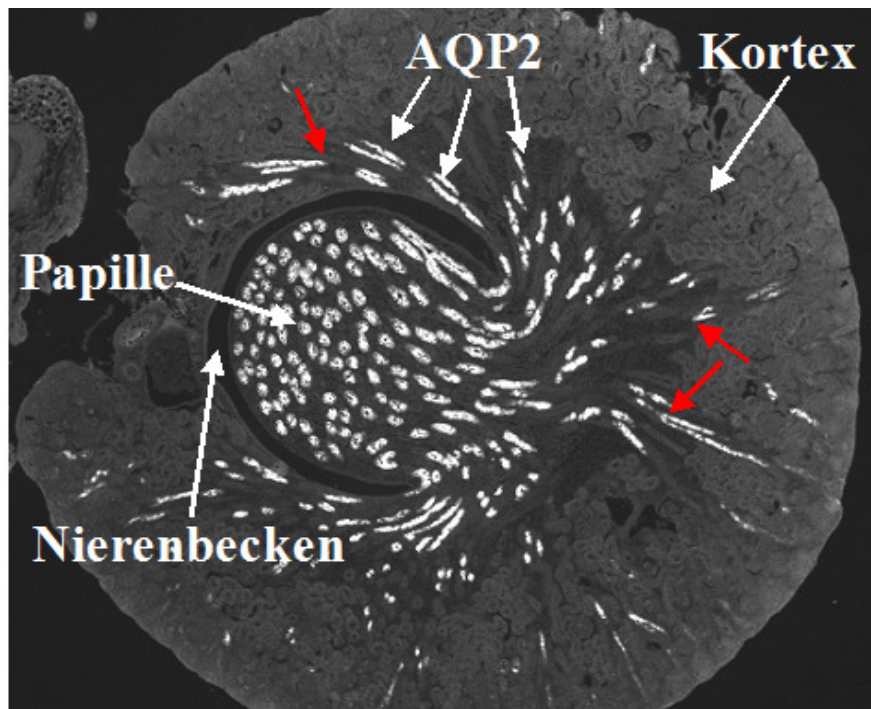


Abbildung 3.14: Histologischer Querschnitt durch eine Niere am postpartalen Tag drei. AQP2-Signale sind weiß dargestellt. Mit roten Pfeilen sind Verzweigungsstellen im Sammelrohrsystem gekennzeichnet.

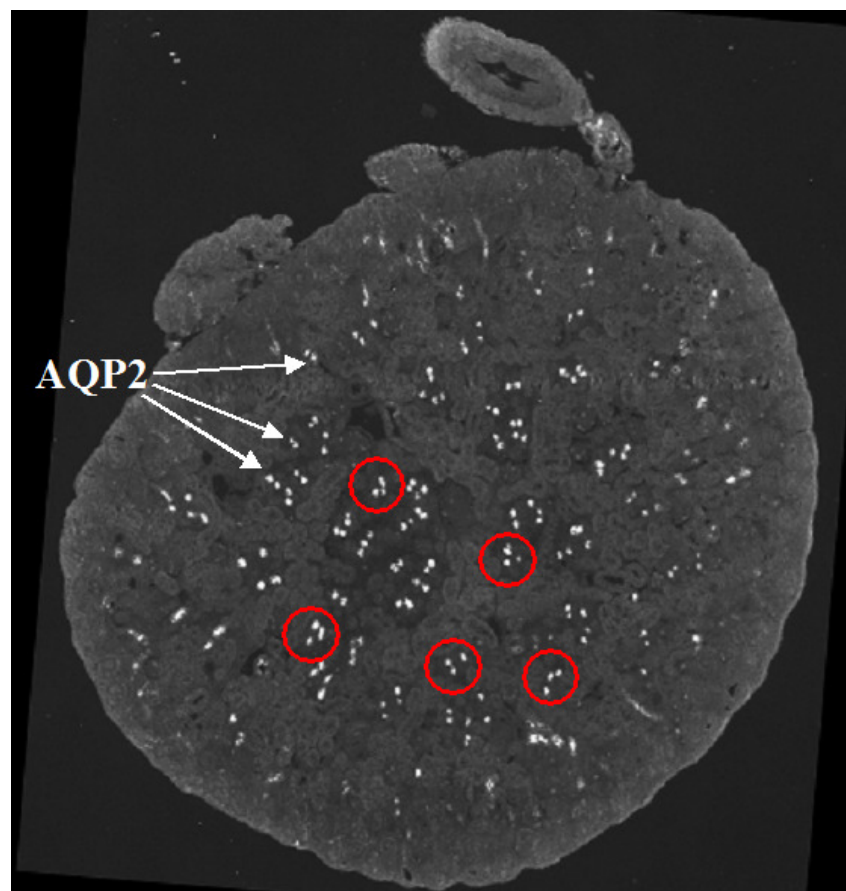


Abbildung 3.15: Histologischer Querschnitt durch eine Niere im Stadium pp3. AQP2-Signale sind weiß dargestellt. Rote Kreise markieren die gruppenförmige Anordnung kleiner Sammelrohre im Bereich des Kortex.

Adultzustand

Zu sehen ist der zentripetale Verlauf der Sammelrohre, die in der Papille dicht nebeneinander verlaufen (Abbildung 3.16). Gegenüber der drei Tage alten Niere wird in der adulten Niere mehr AQP2 exprimiert. Die AQP2-Expression nimmt vor allem in den äußeren Nierenschichten zu. Unmittelbar unterhalb der Kapsel können zahlreiche AQP2-Signale erkannt werden (Abbildung 3.17).

In allen Entwicklungsstadien ist zu erkennen, dass die Sammelrohre ausschließlich über die Papille in das Nierenbecken münden.

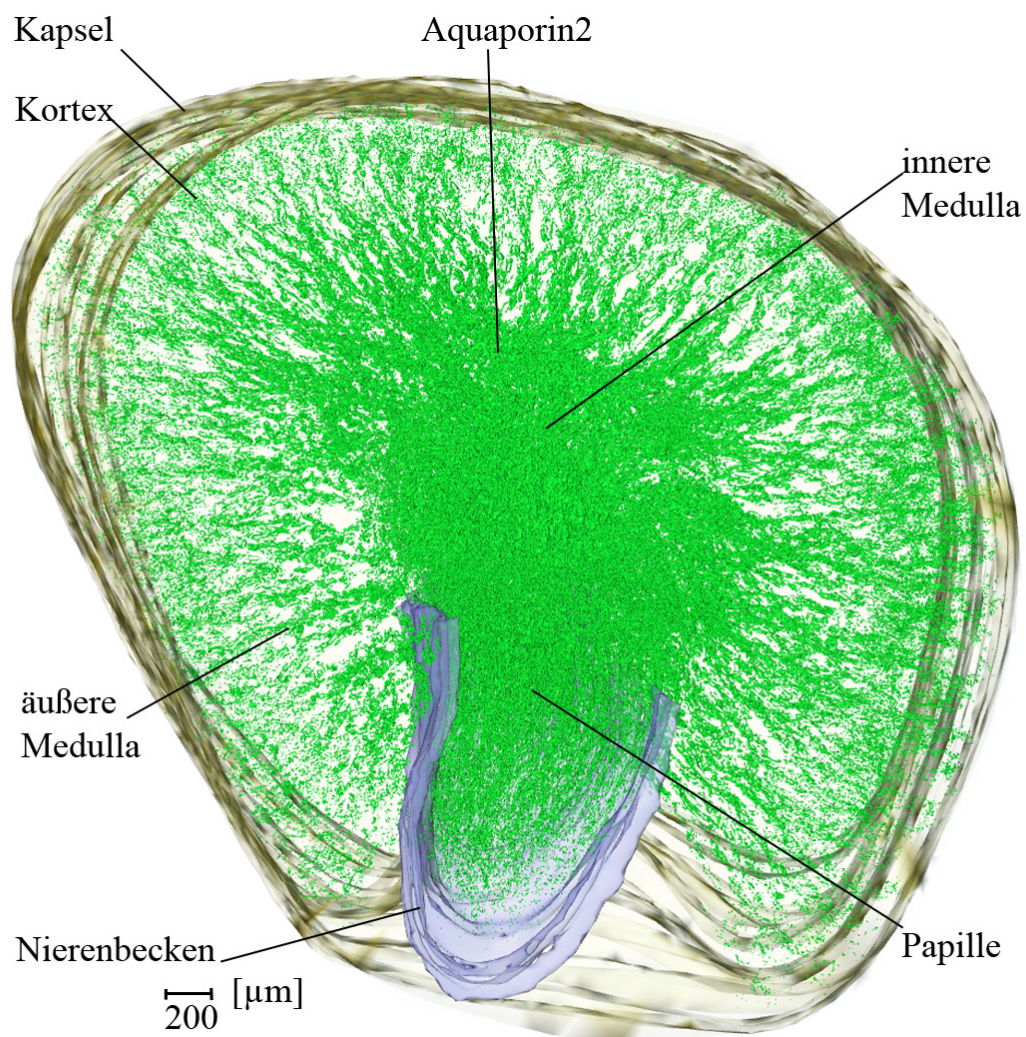
Adult (Querschnitt)

Abbildung 3.16: Aquaporin2 (grün) in der adulten Niere. Kapsel (transparent), Nierenbecken (blau). Modell zusammengesetzt aus 198 Querschnitten à 5 µm aus der Mitte des Organs.

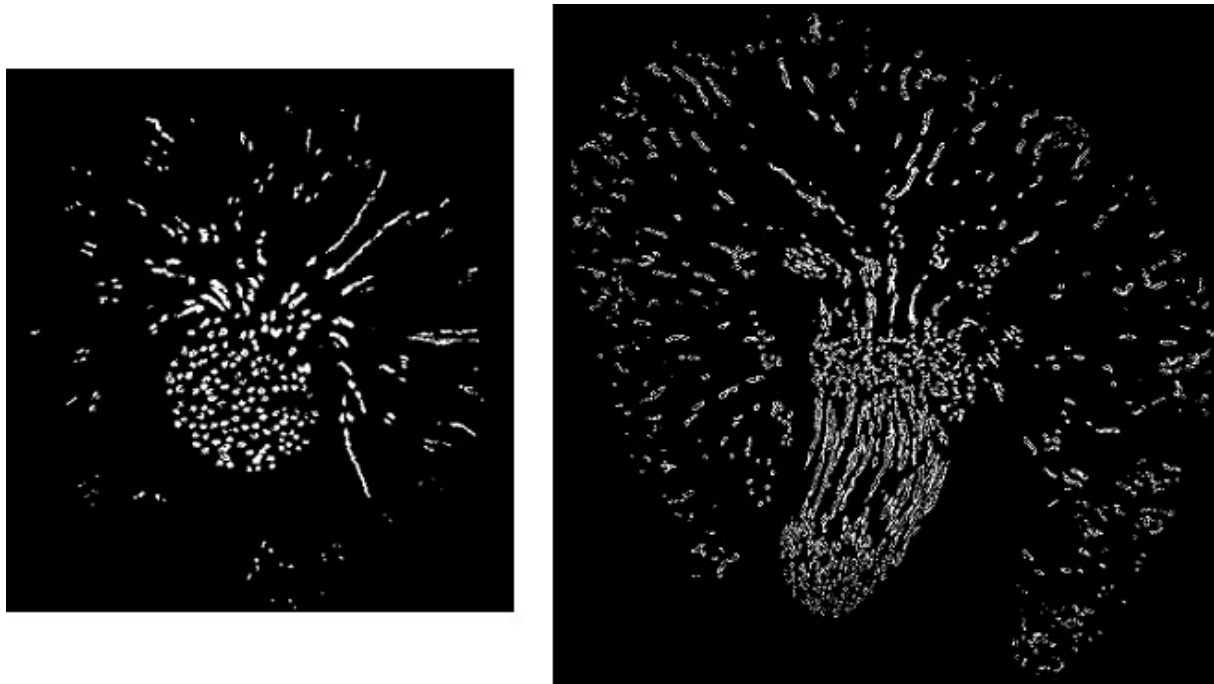


Abbildung 3.17: Links: Querschnitt durch eine Niere im Stadium pp3. Rechts: Querschnitt durch eine adulte Niere. Es wurden jeweils Schnitte aus der Mitte des Organs gewählt. In weiß sind alle AQP2-Signale dargestellt. Die AQP2-Expression nimmt v. a. im Kortexbereich zu. Alle Sammelrohre münden via Papille in das Nierenbecken.

3.3 Zelluläre Analyse von Aquaporin2

3.3.1 Verteilung von Glattmuskelaktin und Aquaporin2 innerhalb der Niere

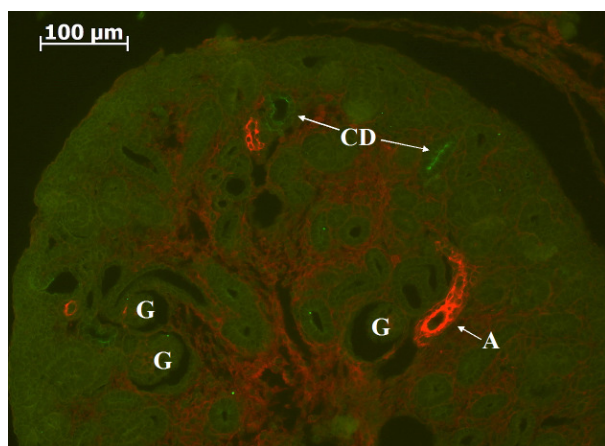
Von Nieren in den Entwicklungsstadien E16, E17, E18, pp3 und adult wurden Serienschritte angefertigt. Alle Schnitte wurden immunhistochemisch gegen Glattmuskelaktin und gegen AQP2 gefärbt.

Die im dreidimensionalen Modell gezeigte Verteilung der Gefäße und der Sammelrohre kann bereits auf immunfluoreszenz gefärbten Schnitten vermutet werden. Die in rot dargestellten Signale von Glattmuskelaktin sind eher kortikal gelegen, wohingegen AQP2 (grün) vor allem in der Papillenregion lokalisiert ist (Abbildung 3.18). Mesenchymareale besonders im Inneren der Niere reagieren ebenfalls mit dem Antikörper. Weil die Wand des Ureters Glattmuskelaktin enthält, wird auch er in der Färbung gegen Glattmuskelaktin markiert (auf den gezeigten Schnitten nicht zu sehen). Die Glomeruli sind durch ihre Eigenfluoreszenz zu erkennen. Im Gewebe unmittelbar unterhalb der Kapsel, der so genannten nephrogenen Zone, sind kleine, sich erst entwickelnde Glomeruli angeschnitten. Die rot markierten Strukturen innerhalb der reifen Glomeruli entsprechen Kapillarschlingen, aus denen im Glomerulum der Primärharn filtriert wird. Anschnitte des proximalen und distalen Tubulus sowie der Henle Schleife sind auf Grund ihrer Eigenfluoreszenz zu erkennen.

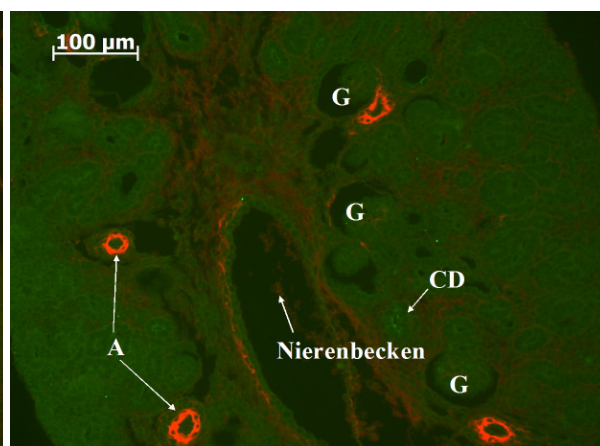
Die histologischen Schnitte zeigen, dass die Menge an exprimiertem AQP2 stets steigt. AQP2 wurde erstmals am Embryonaltag 16 nachgewiesen. Während auf diesem Schnitt nur einzelne Tubuli mit Hilfe der Färbung gegen AQP2 als Sammelrohre erkannt werden können, nimmt die Anzahl der Sammelrohre mit zunehmendem Alter des Organs beständig zu. Am postpartalen Tag drei und im Adultzustand, kann beobachtet werden, dass es sich bei der Mehrzahl der Tubuli im Papillenbereich um Sammelrohre handelt. In der Rindenregion überwiegen nach wie vor andere Tubulussegmente, die Anschnitte des proximalen Tubulus, der Henle Schleife und des distalen Tubulus. Die nephrogene Zone ist frei von AQP2. Erst postpartal, wenn auch dieser Bereich der Niere ausgereift ist, wird direkt subkapsulär AQP2 gebildet.

In Abbildung 3.18 ist auf dem linken Bild jeweils ein Ausschnitt aus dem Kortextbereich zu sehen. Das rechte Bild zeigt einen Schnitt aus der Region des Nierenbeckens aus dem selben Organ.

E16

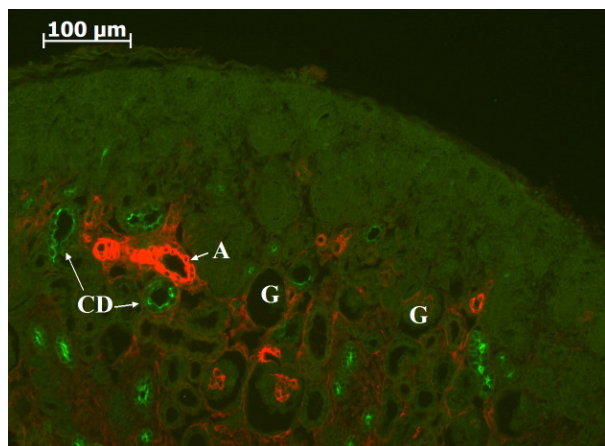


Kortex

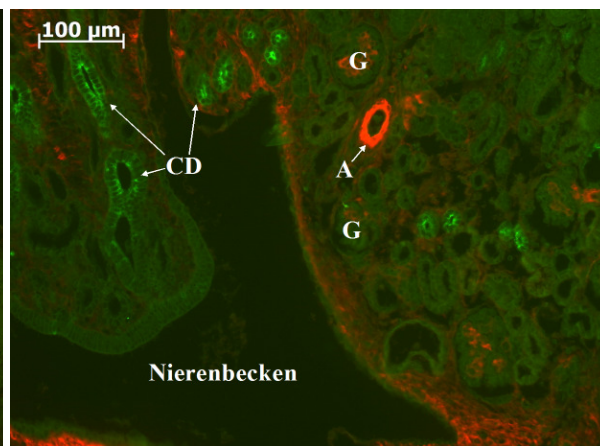


Papille

E17

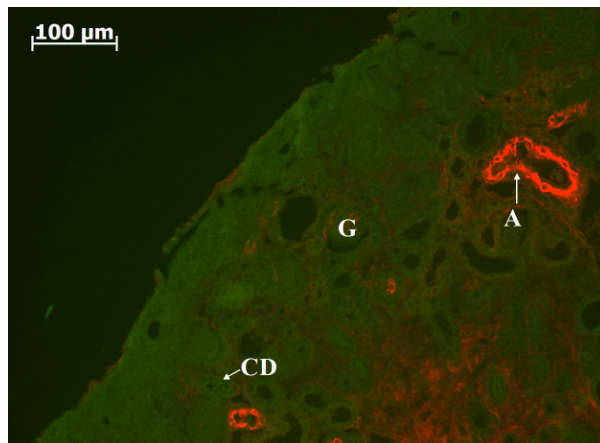


Kortex

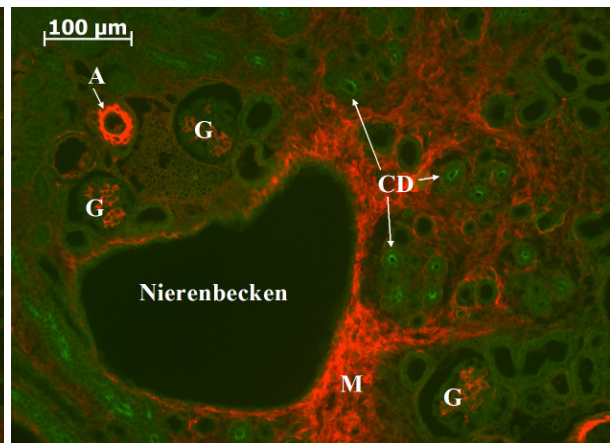


Papille

E18

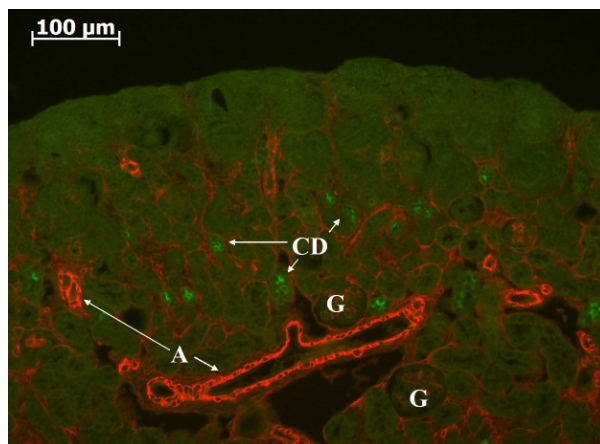


Kortex

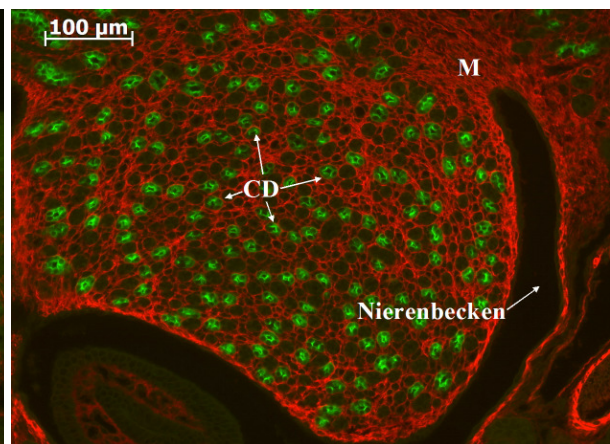


Papille

pp3

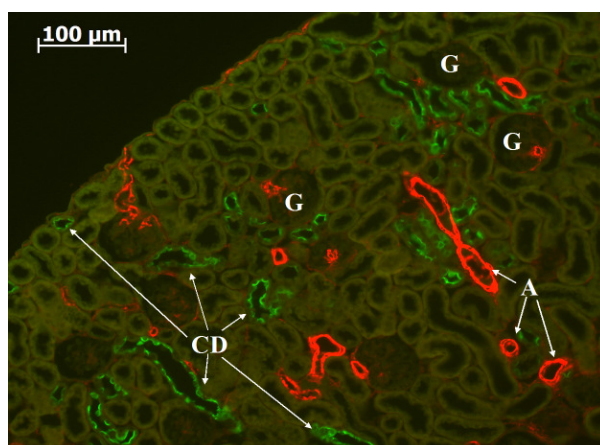


Kortex

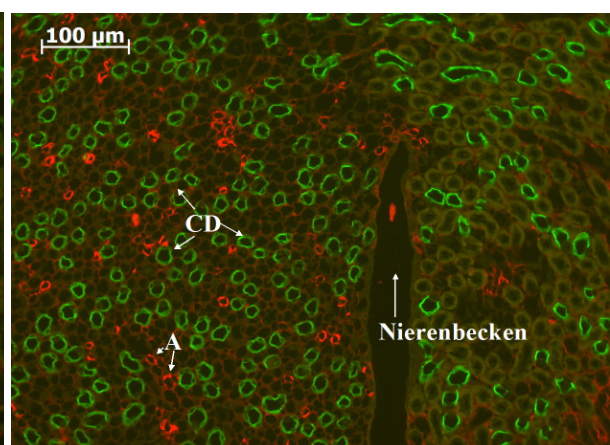


Papille

adult



Kortex



Papille

Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung der Stadien E16, E17, E18, pp3 und adult. Rot: Glattmuskelaktin, grün: AQP2. CD: Sammelrohr. A: Arterie. G: Glomerulum. M: Mesenchym. In den Stadien E16, E17 und E18 sind Längsschnitte gezeigt. Bei den Stadien pp3 und adult handelt es sich um Querschnitte. Vergrößerung: 200 fach.

3.3.2 Verteilung von Aquaporin2 in den Hauptzellen der Sammelrohre

Mit Hilfe der Immunhistochemie konnte die genaue intrazelluläre Lokalisation von AQP2 detektiert werden (Abbildung 3.19 - Abbildung 3.25).

Die Schnitte wurden in einer 630 fachen Vergrößerung aufgenommen.

E16

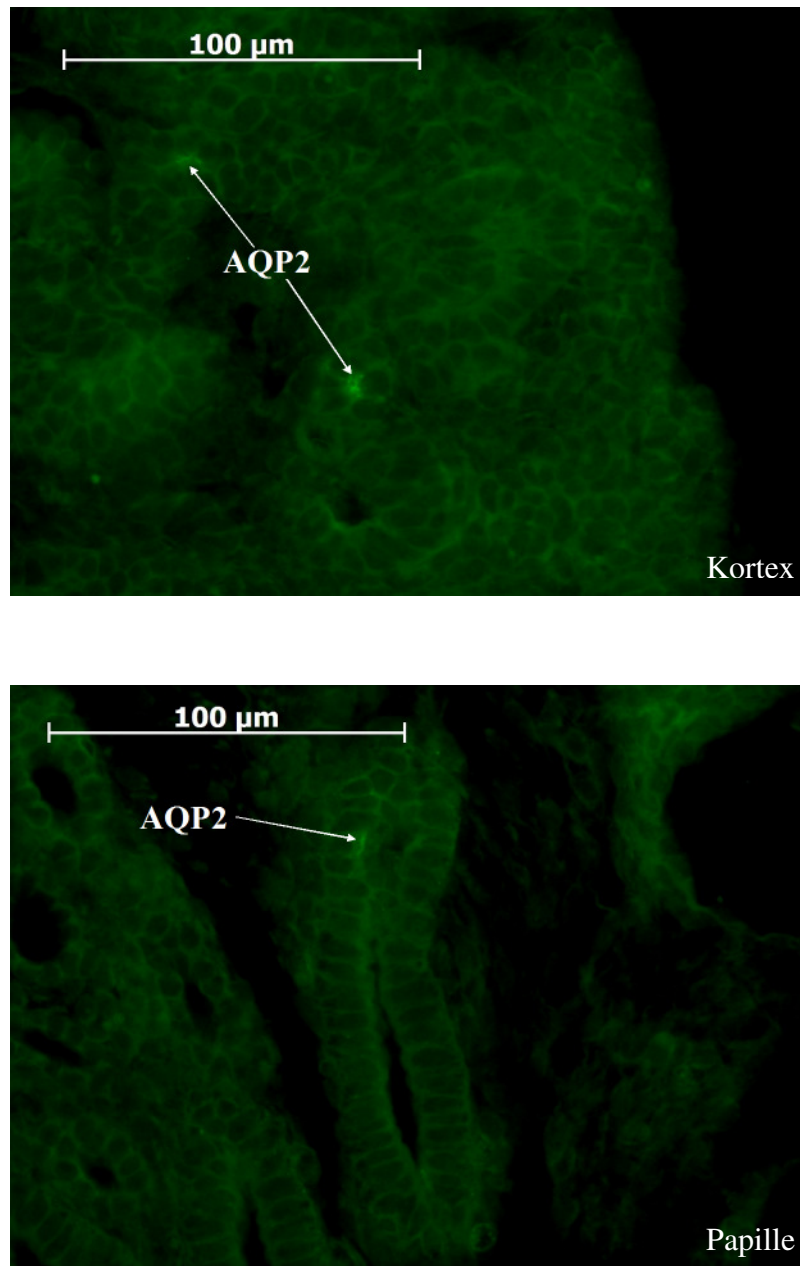


Abbildung 3.19: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E16

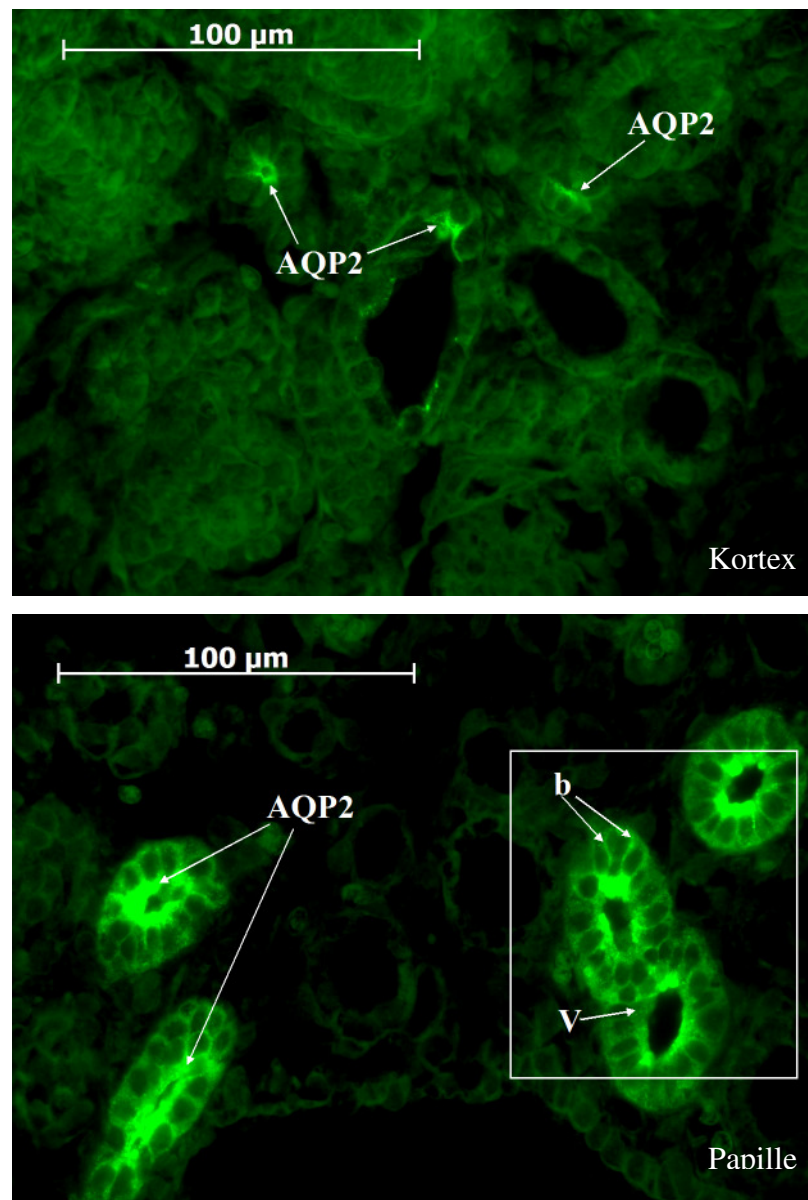
E17

Abbildung 3.20: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E17 (V: Vesikel, b: basolateral)

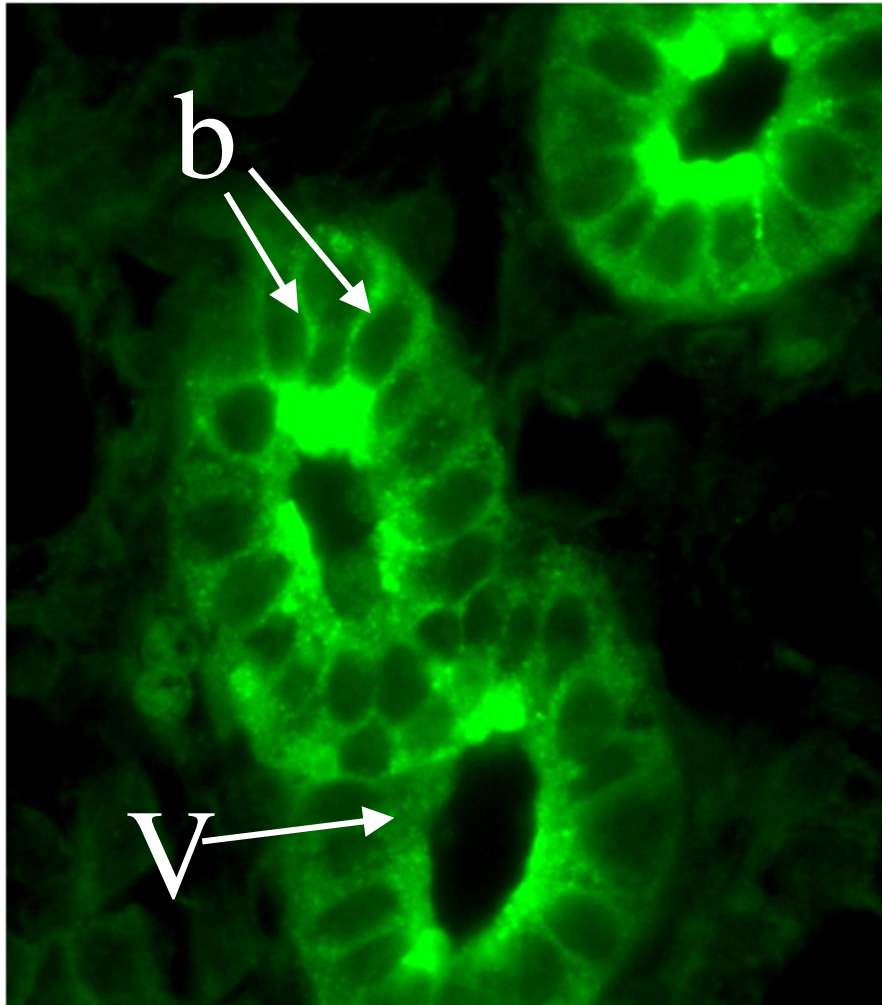
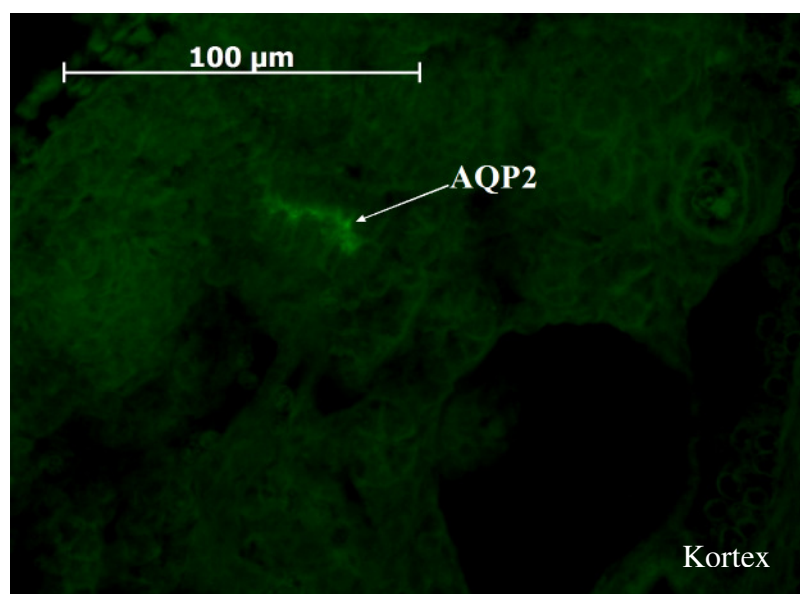


Abbildung 3.21: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Stadium E17 (V: Vesikel, b: basolateral)

E18



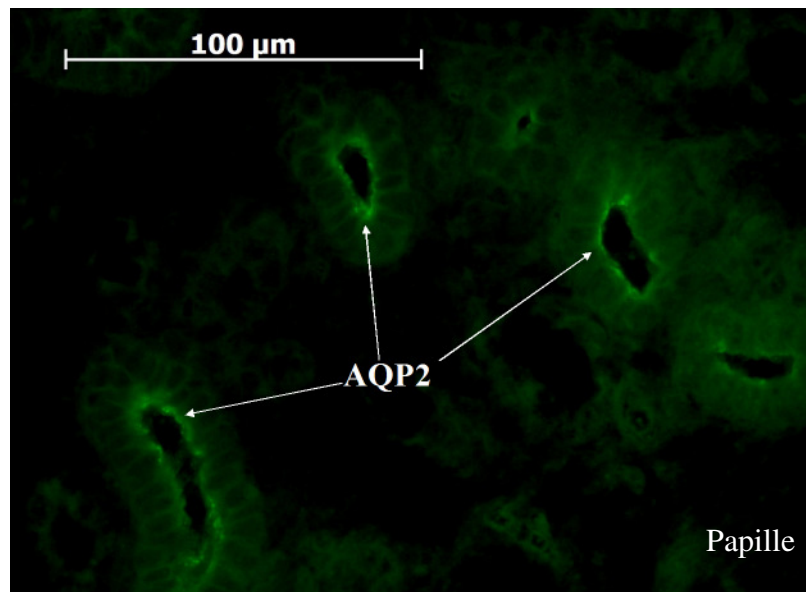
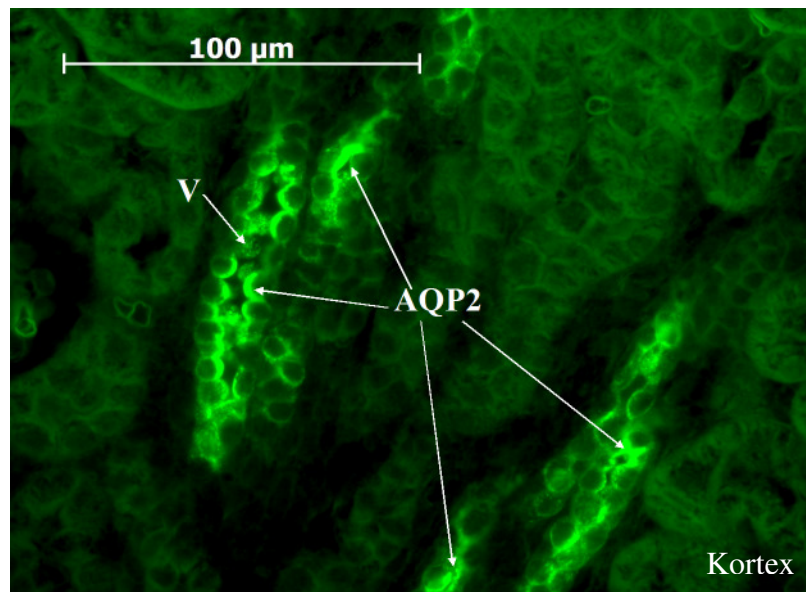


Abbildung 3.22: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E18

pp3



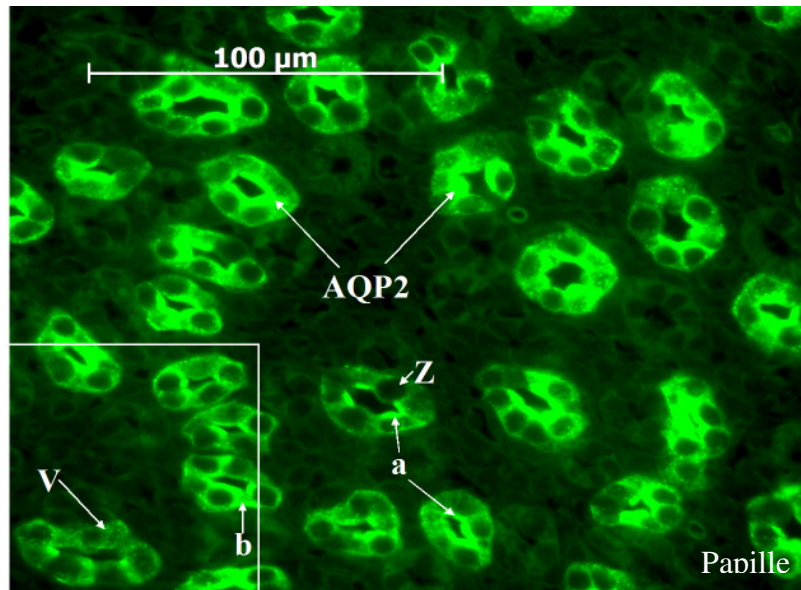


Abbildung 3.23: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 drei Tage nach der Geburt (V: Vesikel, b: basolateral, a: apikal, Z: Zwischenzelle)

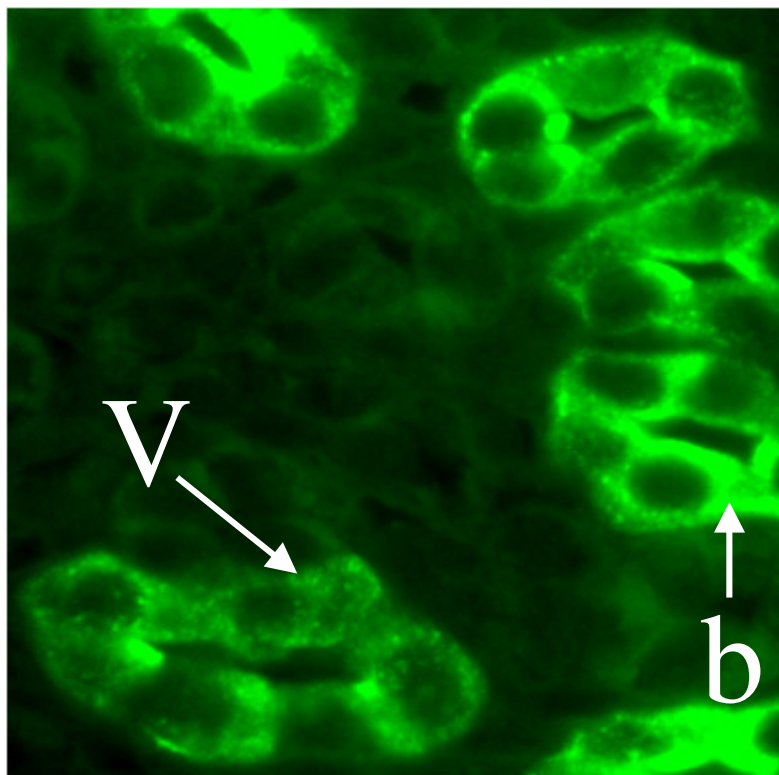


Abbildung 3.24: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Stadium pp3 (V: Vesikel, b: basolateral)

adult

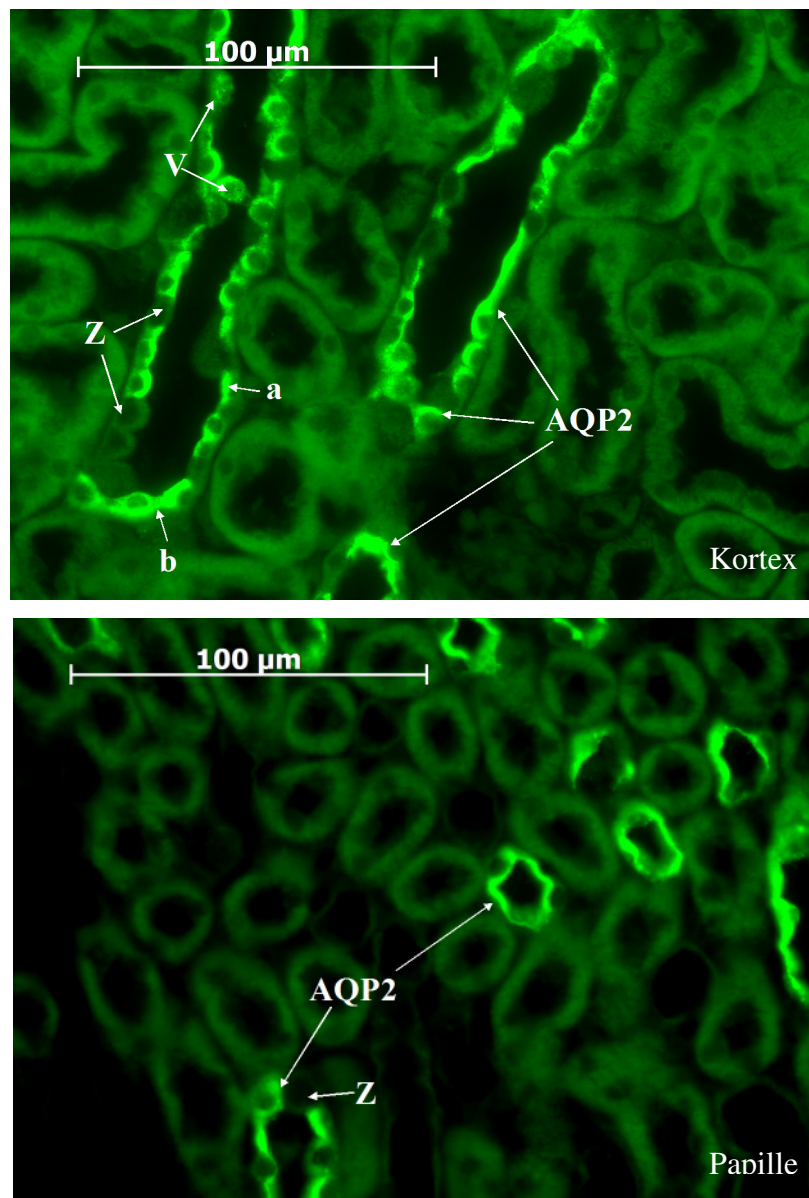


Abbildung 3.25: Intrazelluläre Verteilung von AQP2 im Adultzustand (V: Vesikel, Z: Zwischenzelle, b: basolateral, a: apikal)

Die dargestellten histologischen Schnitte wurden in grün gegen AQP2 gefärbt. Die AQP2-markierten Tubuli entsprechen den Sammelrohren, ungefärbte Tubuli sind Anschnitte des proximalen und distalen Tubulus, sowie der Henle Schleife.

Bei der Betrachtung der einzelnen Schnitte fällt auf, dass nicht alle Zellen eines Sammelrohrs gefärbt sind. Das Sammelrohr besteht aus AQP2-haltigen Hauptzellen und AQP2-freien Zwischenzellen.

Im Entwicklungsstadium E16 und E18 ist AQP2 ausschließlich apikal nachweisbar. Auf den Schnitten von E17, pp3 und der adulten Niere ist zusätzlich eine basolaterale Lokalisation zu sehen. Dabei ist die basolaterale Lokalisation zunächst auf den papillären Bereich der Niere

beschränkt. Im Adultzustand ist AQP2 sowohl in kortikalen Schichten, als auch in der Papille basolateral zu finden. Zum Teil ist die ganze Zelle AQP2-haltig. AQP2 wird in Vesikel gespeichert. Im Stadium E17 ist die vesikuläre Speicherung auf die Papille beschränkt, postpartal findet im gesamten Organ eine vesikuläre Speicherung statt. Die Färbungen wirken in weiter entwickelten Stadien kräftiger als in frühembryonalen Stadien.

3.4 Quantifizierung der Aquaporin2–Expression während der Nierenentwicklung

Eine genaue Quantifizierung der AQP2-Expression wurde mit Hilfe der Computersoftware Amira vorgenommen. Das Programm zählt Voxel in den Rekonstruktionen, um einzelne Volumina zu berechnen. Mit Hilfe dieser Methode wurden das Nierenvolumen, das Gefäßvolumen sowie das AQP2-Proteinvolumen bestimmt. Zudem wurde die AQP2-mRNA mit Hilfe eines Light Cyclers gemessen.

Als adult wurde ein Tier im Alter von mindestens 40 Tagen angesehen.

Das Nierenvolumen wurde an Hand der Voxel der Nierenkapsel mittels Amira bestimmt (Abbildung 3.26), wobei das Volumen des Nierenbeckens abgezogen wurde.

Nierenvolumen

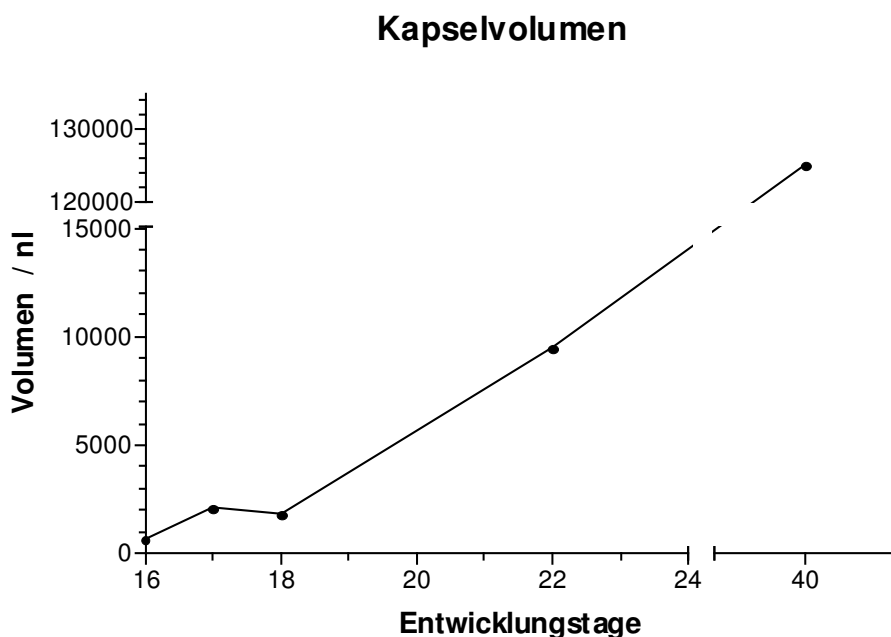


Abbildung 3.26: Entwicklung des Nierenvolumens. Bestimmt an Hand der Rekonstruktion der Kapsel und des Nierenbeckens durch die Computersoftware Amira.

In der Entwicklungsphase von E16 bis E17 vergrößert sich das Nierenvolumen um mehr als den Faktor drei. Dies spiegelt einen großen Wachstumsschub in dieser Phase der Entwicklung wider. Dagegen bleibt die Größe der Organe vom Tag 17 auf den Tag 18 nahe zu konstant. Bis zum Tag pp3 findet eine Volumenzunahme fast um den Faktor fünf statt, d. h. die betrachtete Niere hat in ca. vier Tagen ihre Größe verfünffacht. Bis die endgültige Größe einer Mausniere erreicht ist, vergrößert sich das Volumen ausgehend vom Tag E16 um den Faktor 200.

Gefäßvolumen

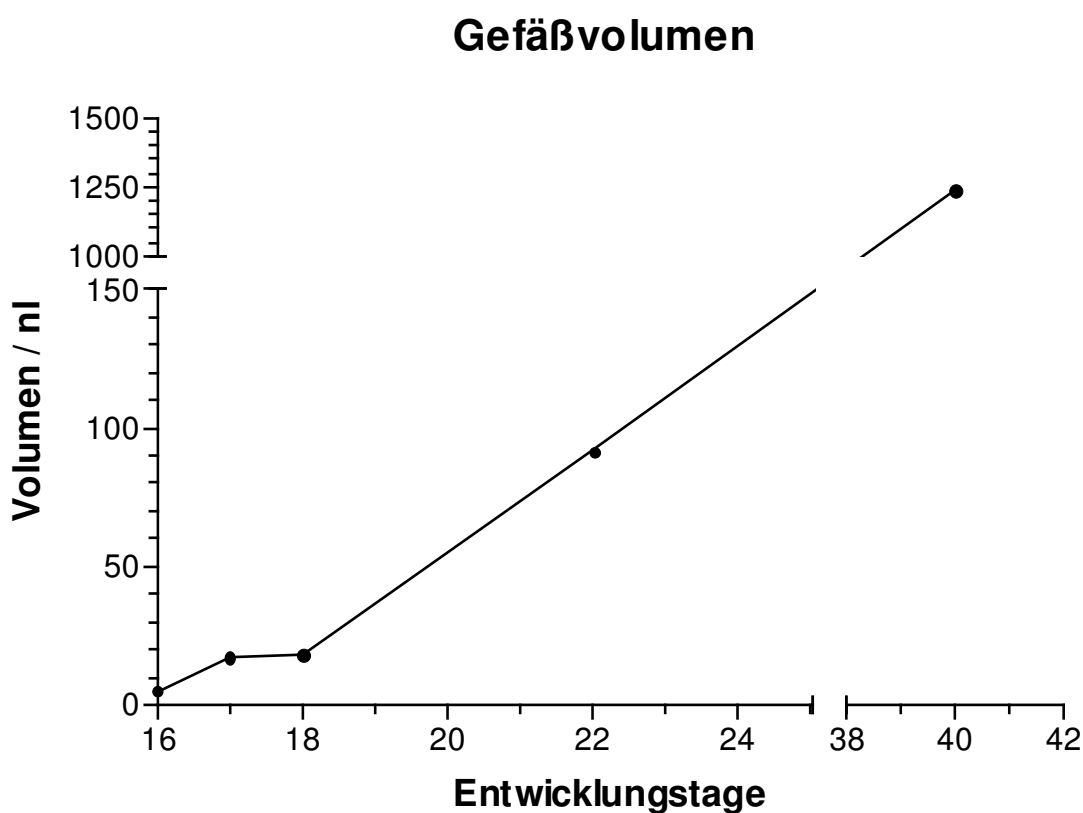


Abbildung 3.27: Entwicklung des Gefäßvolumens. Bestimmt an Hand der Aktinpixel mit Hilfe der Computersoftware Amira.

Nicht nur das Volumen der ganzen Niere nimmt im Laufe der Entwicklung bis zum Erreichen des Adultzustands zu (Abbildung 3.26), auch das Gefäßvolumen steigt an (Abbildung 3.27). Das Gefäßvolumen wurde mit Hilfe der Aktinvoxel gezählt.

Ausgehend von einem Volumen von 5nl am Tag E16 nimmt das Gefäßvolumen um mehr als den Faktor drei am Tag E17 zu. Bis zum Tag E18 bleibt das Volumen nahezu unverändert. Im Stadium pp3 nehmen die Gefäße ein um den Faktor fünf gesteigertes Volumen im Vergleich

zu Tag E17/E18 ein. Im Adultzustand ist das Gefäßvolumen um fast den Faktor 250 gegenüber dem Ausgangsvolumen vergrößert.

Wenn man das Verhältnis der Aktinvoxel zu denen der ganzen Niere setzt, so machen die Gefäße in jedem Entwicklungszustand knapp 1% der Niere aus.

Aquaporin2-Volumen

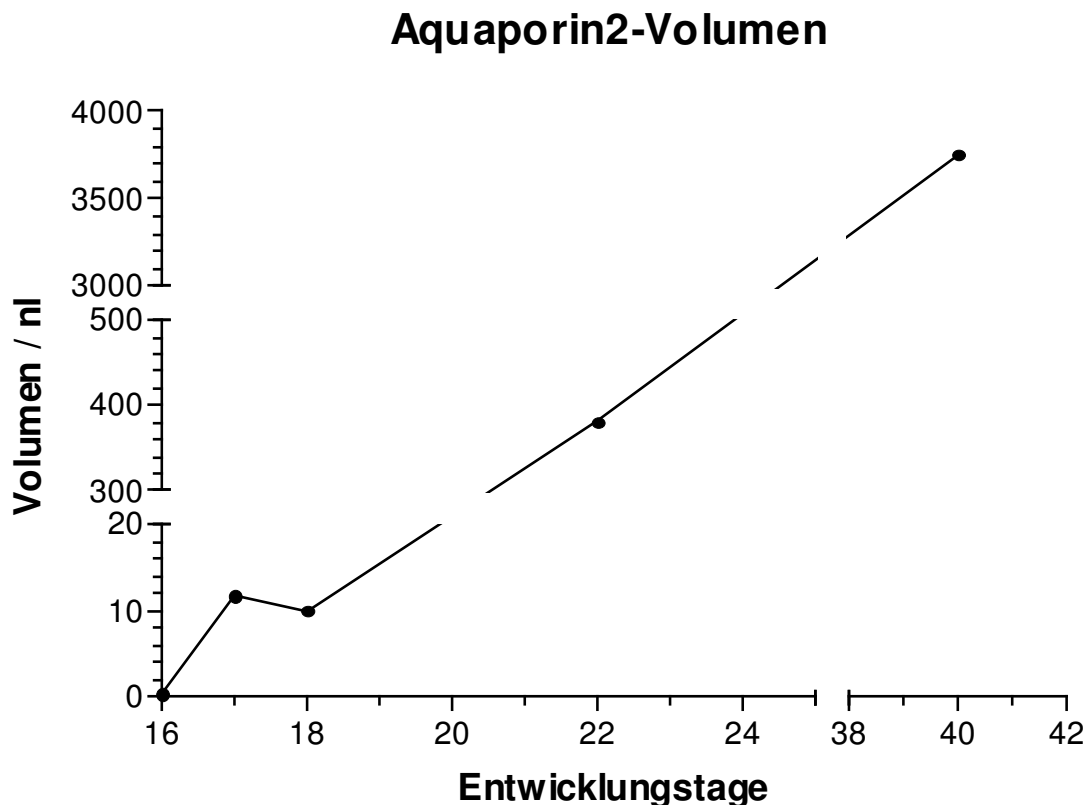


Abbildung 3.28: AQP2-Protein-Volumen. Bestimmt an Hand der Pixel der Signale gegen AQP2 durch die Computersoftware Amira.

Abbildung 3.28 zeigt die Zunahme der Proteinexpression von AQP2. Die Werte wurden mit Hilfe der Computersoftware Amira generiert. Das Programm zählt die Voxel der AQP2-Signale.

Am Tag E16 ist das Volumen des Kanalproteins AQP2 mit 0,33nl im gesamten Organ kaum noch nachweisbar. Dies entspricht einem Anteil von ca. 0,05% am Gesamtvolumen der Mausnieren. In den nächsten 24 Stunden setzt eine enorme Expressionssteigerung ein, so dass am Tag E17 bereits mehr als das 35fache der ursprünglichen AQP2-Menge gebildet wird. Drei Tage nach der Geburt besitzt das Tier mit 381 nl AQP2 mehr als 1000mal so viel AQP2 wie zu Beginn der Untersuchung am Tag E16. Bis zum Erreichen des Adultzustand, der dem

Zustand der Organreife entspricht, wird dieses Volumen erneut um fast den Faktor zehn vermehrt.

Im Verhältnis zum Gesamtwachstums der Niere, steigt das AQP2-Volumen vom Tag E16 zum Tag E17 und E18 um den Faktor 10. Der Anteil von AQP2 drei Tage nach der Geburt ist wiederum um etwa den Faktor 10 höher als zum Zeitpunkt E18. Im Adultzustand macht AQP2 ca. 3% des Gesamtnierenvolumens aus. Gegenüber dem Stadium pp3 ergibt sich keine prozentuale Erhöhung am Anteil des Gesamtvolumens.

Aquaporin2-mRNA- Gehalt

Der mRNA-Gehalt wurde mit Hilfe des Light Cyclers gemessen (Abbildung 3.29). Die Messung bestätigt die Zunahme von AQP2 während der Entwicklung.

Während am Embryonaltag 15 nahezu kein AQP2 nachweisbar ist und auch in den darauf folgenden Tagen mit einer Zunahme um den Faktor 5 am Embryonaltag 16 und von jeweils ca. 1,5 an den weiteren Embryonaltagen nur vergleichsweise wenig AQP2-RNA vorhanden ist, nimmt der RNA-Gehalt an AQP2 in den postpartalen Stadien in großen Sprüngen zu und erreicht im Adultzustand seinen maximalen Wert, der mehr als dem 500fachen des am Tag E15 gemessenen Wertes entspricht (Abbildung 3.29).

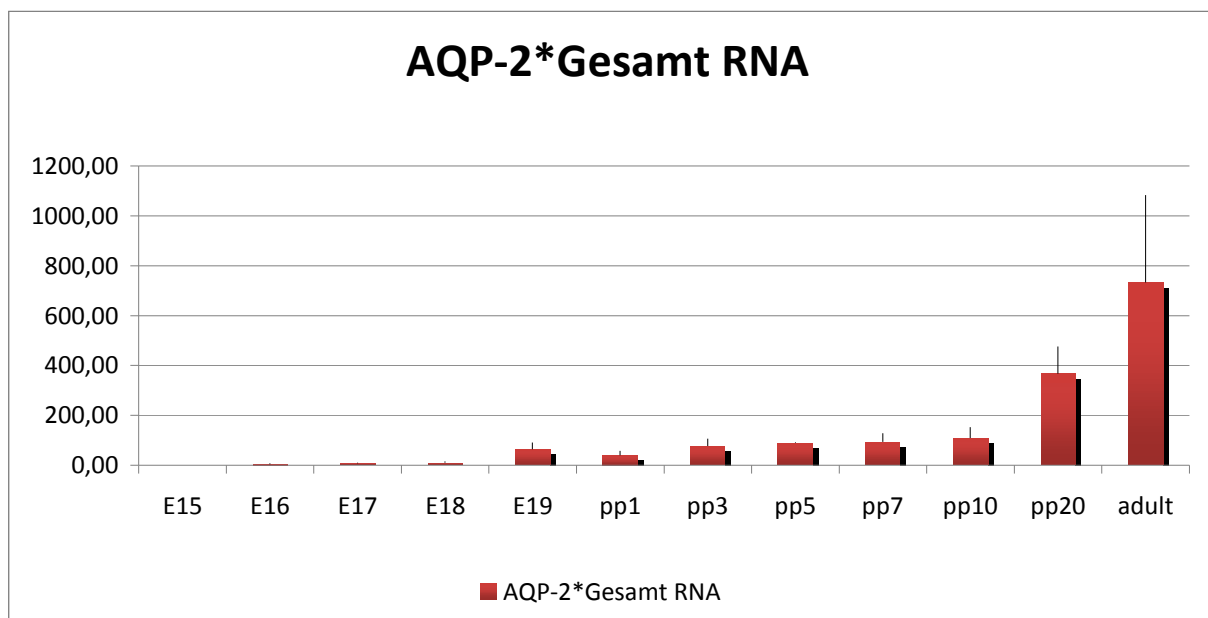


Abbildung 3.29: AQP2-Gesamt-RNA im Laufe der Entwicklung der Mausniere

Für die Berechnung der AQP2 mRNA-Abundanz (Abbildung 3.30) wurde 1 µg der isolierten Gesamt-RNA eingesetzt. Als Bezugssystem diente GAPDH.

Die AQP2 mRNA-Abundanz steigt im gleichen Verhältnis wie die Gesamt-RNA.

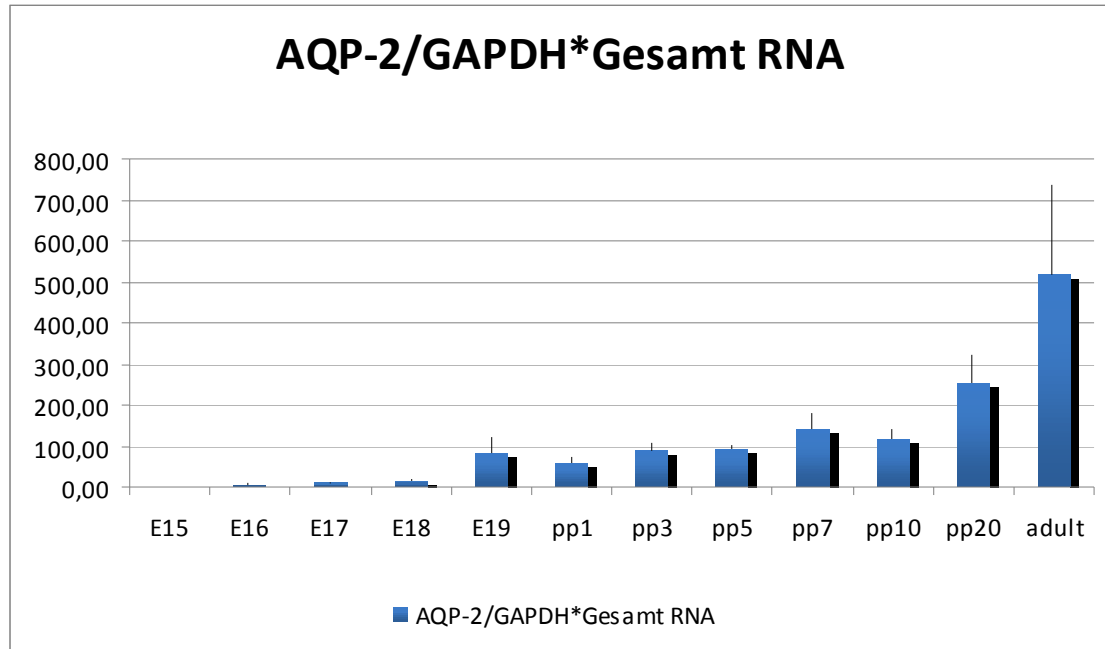


Abbildung 3.30: AQP2-RNA-Abundanz

4 Diskussion

Viele Arbeiten haben sich mit der Entwicklung des Sammelrohrsystems beschäftigt (Saxén, 1987; Clark und Bertram, 1999; Cebrári et al., 2004). In den letzten Jahren wurde zunehmend das Kanalprotein AQP2 Zielpunkt der Forschung (Kamsteeg et al., 2000; Nielsen et al., 2002; Bedford et al., 2003). Dabei stand vor allem die Signalkaskade zum Einbau von AQP2 in die apikale Membran im Vordergrund (Nishimoto et al., 1999; Fushimi et al., 1997). Ziel dieser Arbeit war es, mehr über die Entwicklung und Verteilung von AQP2 als Marker für das Sammelrohrsystem in der Mausniere herauszufinden und seine intrazelluläre Lokalisation zu beschreiben.

4.1 Zeitlich-räumliche Verteilung von Aquaporin2 in der Mausniere

In der Niere fließt der im Glomerulum gebildete Primärharn über das Tubulussystem, bestehend aus proximalem Tubulus, Henle Schleife, distalem Tubulus und Sammelrohr, in das Nierenbecken. Auf diesem Weg wird der Harn durch Sekretion und Reabsorption verschiedener Stoffe modifiziert (Schmidt et al., 2005). In den Sammelrohren wird durch die AQP2 vermittelte Wasserresorption der Urin konzentriert (De Wardener und Herxheimer, 1957). AQP2 ist in den Hauptzellen der Sammelrohre lokalisiert (Abbildung 3.19 - Abbildung 3.25) und diente in dieser Arbeit als Markerprotein für das Sammelrohrsystem.

Im Entwicklungsstadium E16 tritt AQP2 zum ersten Mal während der Nierenentwicklung punktuell in Erscheinung. Die Signale finden sich überwiegend im Bereich der äußeren Medulla und des Kortex in großlumigen Sammelrohren (Abbildung 3.7). Bereits ca. 24 Stunden später, am Embryonaltag 17 (Abbildung 3.9), wird ersichtlich, dass diese punktuellen Signale ein Bestandteil von sich entwickelnden Röhren, den Sammelrohren, sind. Die Sammelrohre beginnen in der Peripherie, das heißt im Kortexbereich und im Bereich der äußeren Medulla, und münden über die Papille in das Nierenbecken. Diese kortikopapilläre Richtung wurde auch von Pannabecker et al. (2004) in einer 3D-Rekonstruktion diverser Tubuli in der Papille postuliert. Da alle Sammelrohre ausschließlich über die Papille in das Nierenbecken münden, liegen die Signale in der Papille dichter aneinander.

Sowohl die Rekonstruktionen, als auch die zu Grunde liegende Histologie zeigen, dass die AQP2-Expression im Laufe der Entwicklung steigt. Zum Einen nimmt die Zahl der Sammelrohre zu, zum Anderen steigt die Proteinexpression in den einzelnen Sammelrohren. In der nephrogenen Zone, dem Bereich unmittelbar unterhalb der Kapsel, in dem sich die Glomeruli erst entwickeln, ist embryonal kein AQP2 zu sehen (Abbildung 3.18). Dies kann an Hand der Funktion von AQP2 erklärt werden: in Arealen, in denen kein Harn oder nur wenig

Harn filtriert wird, muss auch kein Wasser zurück gewonnen werden. Im Adultzustand nimmt die kortikale AQP2-Expression zu (Abbildung 3.17). Es ist unklar, ob hierbei AQP2 ausschließlich in den Sammelrohren lokalisiert ist oder ob funktionsbedingt zunehmend AQP2 auch in den Hauptzellen des Verbindungstubulus gebildet wird. Das Vorkommen von AQP2 im Verbindungstubulus wird von Nielsen et al. (2002) postuliert.

Saxén (1987) beschreibt, dass die Sammelrohre durch dichotome Teilungen der Ureterknospe entstehen. An Hand der ersten Teilungen wird das Nierenbecken gebildet. Neben Bifurkationen sind, wenn auch seltener, Trifurkationen und laterale Aussprossungen der Sammelrohre möglich (Constantini, 2006). Die Histologie bestätigt Aufzweigungen der Sammelrohre und zeigt durch die Anordnung von zwei bzw. drei nebeneinander liegenden Sammelrohren in der Kortexregion, dass Bifurkationen und Trifurkationen stattgefunden haben. Im Bereich der äußeren Medulla und des Kortex ist über längere Strecken ein unverzweigter Verlauf der Sammelrohre nachzuvollziehen. Bei der adulten Mausniere kann an Hand zahlreicher AQP2-Signale unmittelbar unterhalb der Kapsel auf erneute Verzweigungen geschlossen werden (Abbildung 3.11, Abbildung 3.12, Abbildung 3.14, Abbildung 3.15). Dies stimmt mit der Studie von Cebrián et al. (2004) überein, in der eine Elongation der Sammelrohre in der äußeren Medulla dokumentiert wird.

Die neonatale Mausniere besteht zu 70% aus Kortex. Der Bereich der inneren Medulla mit der Papillenregion beträgt 30% des Nierenvolumens (Cebrián et al., 2004). Diese Volumenverteilung kommt dadurch zu Stande, dass der Kortex nach allen Seiten wächst, wohingegen die Papille nur in einer Achse wächst (Cebrián et al., 2004). Die Tatsache, dass die embryonale Niere E16 überwiegend aus Kortexarealen und dem Bereich der äußeren Medulla besteht, die Region der inneren Medulla und die Papille allerdings erst rudimentär angelegt sind, erklärt die vorwiegende Verteilung der AQP2-Expression auf das Gebiet des Kortex und der äußeren Medulla. In reiferen Entwicklungsstadien, wenn die Papille in die Länge gewachsen ist, findet sich AQP2 zunehmend in diesem Teil der Niere.

4.2 Harnkonzentrierung bei verschiedenen Tieren und beim Menschen im Laufe ihrer Entwicklung

Diese Studie hat festgestellt, dass bei der Maus die Bildung von AQP2 am Embryonaltag 16 beginnt. Dies entspricht nach Saxén (1987) dem Stadium des Metanephros. Auch in anderen Säugetieren setzt die Synthese von AQP2 erst im Laufe der Entwicklung ein.

Bei Ratten z. B. tritt AQP2 erstmals am Embryonaltag 16 in Erscheinung (RNA-Messung). Immunhistochemisch ist es zunächst in großen Ureterknospen exprimiert und nimmt schließlich seine Position an der apikalen Plasmamembran der Hauptzellen der Sammelrohre ein (Baum et al., 1998).

Im Gegensatz zur Maus sind beim Menschen die Nieren zum Zeitpunkt der Geburt bereits voll ausgereift und funktionstüchtig. Die Fähigkeit, den Urin zu konzentrieren, besitzt der Mensch allerdings nicht von Geburt an. Erst im Alter von 2-12 Monaten gelingt es dem Menschen einen hypertonen Urin in der Osmolarität wie bei einem Erwachsenen zu produzieren. Bei Ratten und Kaninchen dauert diese Reifung etwa 3 Wochen (Baum et al., 1998).

AQP2 ist entscheidend an der Konzentrierung des Urins beteiligt. Zu diesem Ergebnis kam eine Arbeit mit Knockout-Mäusen (Rojek et al., 2006), in der festgestellt wurde, dass AQP2-Knockout-Mäuse nicht im Stande sind den Urin zu konzentrieren. Mäuse mit einem Totaldefekt des AQP2-Gens starben nach ca. zwei Wochen. Tiere bei denen AQP2 im Sammelrohr ausgeknockt wurde, im Verbindungstubulus aber noch exprimiert wurde, erreichten das Erwachsenenalter.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass AQP2 erst im Laufe der Nephrogenese synthetisiert wird. Zuerst wird es im Kortex und in der äußeren Medulla exprimiert. Demnach nimmt der Teil der Sammelrohre, der ein Stück vom Nierenbecken entfernt ist, zuerst seine Funktion auf. Bereits am Embryonaltag 17 (Abbildung 3.9) ist der Verlauf von Röhren zu erkennen. In älteren Entwicklungsstadien (Abbildung 3.13, Abbildung 3.16) nimmt die Zahl der AQP2-exprimierenden Sammelrohre zu. Bis zur Geburt ist die maximale Proteinmenge noch nicht erreicht. Dies führt unter Berücksichtigung der Ergebnisse über das Überleben von AQP2-Knockout-Mäusen von Rojek et al. (2006) zu dem Schluss, dass die Sammelrohre der murinen Niere peripartal noch nicht voll funktionstüchtig sind. Dadurch, dass 90% des Primärurins bereits im proximalen Tubulus und in der Henleschleife rückresorbiert werden (Robben et al., 2006), ist ein Überleben der Tiere dennoch möglich.

Japanische Forscher (Nishimura et al., 2007) untersuchten die mRNA-Entwicklung eines AQP2-Homologs in Wachteln. Vogelnieren besitzen neben schleifenlosen Nephronen, die reptilienspezifisch sind, wie die Säugetiere Tubuli mit einer Henle Schleife. Mit Hilfe einer mRNA-Hybridisierung an embryonalen und postpartalen Wachteln fanden die Forscher heraus, dass das AQP2-Homolog erst im Metanephros ab dem Embryonaltag 10 exprimiert wird. Der Mesonephros war stets AQP2-frei. In ihrer Arbeit vermuten sie, dass AQP2 zuerst im Bereich der inneren Medulla erscheint. Sie berichten in frühen Entwicklungsstadien von einer Expression in größeren Sammelrohren und von einer Zunahme der mRNA-Menge des AQP2-Homologs im Laufe der Entwicklung. Dies bedeutet, dass zum Zeitpunkt des Mesonephros noch keine AQP2-abhängige Urinkonzentrierung bei Wachteln möglich ist und dass diese Funktion in den größeren Sammelrohren nahe der Papille beginnt. In der Aussage, dass die AQP2-Expression im Laufe der Embryogenese kontinuierlich zunimmt und dass der Mesonephros AQP2-frei ist, stimmt die Arbeitsgruppe mit dieser Arbeit überein. Ein Beginn der AQP2-Expression in tieferen Markschichten kann nicht bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass AQP2 zunächst vor allem in kortikalen Sammelrohren und in Sammelrohren der äußeren Medulla eingebaut wird. Da die Forschungsgruppe um Nishimura et al. (2007) ihre Ergebnisse mit einer anderen Methode erhoben haben und andere Versuchstiere eingesetzt haben, können die Ergebnisse der japanischen Forscher mit den Ergebnissen dieser Studie nur indirekt verglichen werden.

4.3 Intrazelluläre Verteilung von Aquaporin2

Nielsen et al. (2002) beschreiben, dass das Kanalprotein AQP2 nur in den Hauptzellen der Sammelrohre und des Verbindungstubulus gefunden wird und die Zwischenzellen AQP2 frei sind. AQP2 ist apikal und subapikal lokalisiert. Im Bereich der inneren Medulla, ist AQP2 zudem auf der basolateralen Zellseite anzutreffen.

Zu diesem Ergebnis kamen Nielsen, Harris et al. auch 1993 in einem Experiment mit Ratten. Ein Teil der Versuchstiere wurde einem 48 Stunden dauernden Durstversuch unterzogen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte AQP2 vor allem auf der cytosolischen Seite der apikalen Membran nachgewiesen werden. Dies korreliert mit der Verwendung eines Antikörpers gegen den auf der cytosolischen Seite sitzenden C-Terminus von AQP2. Dabei fiel eine besonders hohe Konzentration von AQP2 in Falten der Zytoplasmamembran auf. Subapikal färbten sich mit AQP2 beladene Vesikel an. Diese Vesikel wurden auch zu einem geringeren Teil in zentralen und basalen Schichten gefunden. Auch multivesikuläre mit AQP2 beladene Körper,

die wahrscheinlich an der Endozytose der nicht mehr benötigten Kanäle beteiligt sind, konnten nachgewiesen werden. Besonders intensiv waren die Färbungen bei den Ratten im Durstversuch.

Auch Kamsteeg et al. (2000) und Bedford et al. (2003) stellen die Lokalisation lediglich in den Hauptzellen der Sammelrohre fest. Bedford et al. (2003) stimmen mit anderen Forschungsgruppen überein, dass AQP2 apikal und in subapikalen Vesikeln vorhanden ist, von einer basolateralen Lokalisation berichten sie nicht. Brown (2003) lokalisierte AQP2 in den Hauptzellen im Bereich der inneren Medulla basolateral nach Vasopressinstimulation.

Loffing et al. (2000) hatten die Verteilung von AQP2 an Hasen und Ratten untersucht. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass AQP2 überwiegend apikal und subapikal lokalisiert ist. Eine geringe basolaterale Konzentration von AQP2 konnten sie ebenfalls nachweisen. Sie sind sich aber nicht im Klaren darüber, ob die basolateral angefärbten Strukturen tatsächlich AQP2-Kanäle sind, oder ob es sich um im Aufbau ähnliche, bisher noch nicht entdeckte Kanalproteine handelt.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass nicht alle Zellen der Sammelrohre AQP2 enthalten (Abbildung 3.19 - Abbildung 3.25). Es wird angenommen, dass es sich bei den AQP2-haltigen Zellen um die Hauptzellen handelt und die AQP2-freien Zellen den Zwischenzellen entsprechen. Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen von Kamsteeg et al. (2000), Nielsen et al. (2002) und Bedford et al. (2003). Die Feststellung von Nielsen et al. (2002), dass AQP2 an der apikalen Membran zu finden ist, kann an Hand dieser Arbeit zu jedem Entwicklungszustand bestätigt werden. Das Vorkommen basolateral im Bereich der inneren Medulla kann nur zum Teil bestätigt werden. In dieser Arbeit wurde keine scharfe Grenze zwischen dem Bereich der inneren Medulla und der Papille und zwischen dem Kortex und der äußeren Medulla gezogen, da in embryonalen Stadien diese Bereiche erst entstehen und an Hand der verwendeten Antikörper zwischen den einzelnen Regionen nicht unterschieden werden kann. Deshalb werden die Bereiche innere Medulla und Papille sowie die Bereiche Kortex und äußere Medulla zusammengefasst. Eine basolaterale Lokalisation im Bereich der Papille bzw. in der inneren Medulla wurde nur in Schnitten von Nieren der Stadien E17, pp3 und Adult (Abbildung 3.21, Abbildung 3.23, Abbildung 3.24, Abbildung 3.25) gefunden. Diese Stadien sind wie der Gefäßbaum zeigt weiter entwickelt. Im Adultzustand konnte AQP2 zudem in der äußeren Medulla basolateral gelegen nachgewiesen werden. Dies widerspricht den Erkenntnissen von Nielsen et al. (2002), die AQP2 nur in tiefer gelegenen Nierenschichten basolateral lokalisieren konnten. Die von Nielsen et al. (1993) beschriebenen AQP2-beladenen Vesikel im Zellinneren werden in dieser Arbeit in den

weiterentwickelten Stadien E17, pp3 und Adult gesehen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass in unreiferen Stadien quantitativ weniger AQP2 gebildet wurde und deshalb eine vesikuläre Speicherung nicht notwendig ist.

Die Signale der Stadien E16 und E18 (Abbildung 3.19, Abbildung 3.22) wirken schwächer, als bei den weiter entwickelten Nieren E17, pp3 und Adult. Dies beruht darauf, dass am Embryonaltag 16 und 18 AQP2 nur in einem schmalen Saum an der apikalen Zellmembran exprimiert wird, wohingegen in späteren Stadien dieser Saum dicker ist und zum Teil die ganze Zelle einnimmt.

Auf Grund des überwiegend apikalen Erscheinungsbildes von AQP2 darf seine Funktion als Kanalprotein zur Wiederaufnahme von Wasser aus dem Tubuluslumen (Nielsen et al., 2002) anerkannt werden.

4.4 Quantifizierung des Aquaporin2-Volumens im Laufe der Nephrogenese

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass sich die Mauseiere im Laufe der Entwicklung vom Embryonaltag 16 bis zum Adultzustand um den Faktor 200 vergrößert (Abbildung 3.26). Das Gefäßvolumen vergrößert sich im gleichen Zeitraum nicht ganz um den Faktor 250 (Abbildung 3.27). Demgegenüber steigt das mittels Amira bestimmte AQP2-Proteinvolumen (Abbildung 3.28) um mehr als den Faktor 10000. Dazu parallel verlaufen die mit Hilfe des Light Cyclers gemessenen Kurven der Gesamt-mRNA-Expression und der mRNA-Abundanz. Diese Daten zeigen, dass das Wachstum des Gefäßsystems mit der Volumenzunahme in etwa korreliert. AQP2 weist im Gegensatz dazu sowohl in seiner Proteinexpression, als auch auf RNA-Ebene eine verhältnismäßig größere Volumenzunahme auf. Während das arterielle Gefäßsystem stets ca. 1% des Nierenvolumens ausmacht, hat AQP2 am Embryonaltag 16 einen Anteil von ca. 0,05% und im adulten Tier einen prozentualen Anteil von 3% am Gesamtvolumen. Diese Messungen ergeben, dass die Bildung von AQP2 im Laufe der Entwicklung stärker zunimmt als die Bildung von Glattmuskelaktin.

Die Aussage, dass die Glattmuskelaktin-Expression ca. 1% des ganzen Nierenvolumens beträgt, wird von Sauter et al. (2007) bestätigt.

Eine entwicklungsabhängige Zunahme der mRNA-Expression eines AQP2-Homologs wurde auch bei Vögeln dokumentiert (Nishimura et al., 2007).

Aus den parallelen Änderungen des AQP2-Immunreaktivitätsvolumen (Abbildung 3.28), welche der Proteinmenge entspricht, und dem mRNA-Gehalt (Abbildung 3.29) darf

geschlossen werden, dass die Proteinmenge nicht durch einen weiteren Faktor beeinflusst wird, sondern direkt vom Genexpressionslevel abhängt.

4.5 Diskrepanz der erwarteten Ergebnisse im Stadium E17 und E18

Bei der Rekonstruktion der einzelnen Entwicklungsstadien wurde zum Einen eine kontinuierliche Größenzunahme der Gesamtorgane festgestellt, zum Anderen konnte gezeigt werden, dass der AQP2-Gehalt der Versuchsorgane im Laufe der Entwicklung stetig ansteigt. Eine Ausnahme stellen hierbei die Entwicklungstage E17 (Abbildung 3.3) und E18 (Abbildung 3.4) dar. Die Niere am Entwicklungstag E17 ist, was das Volumen betrifft, größer und exprimiert auch mehr AQP2 als die vom Entwicklungszustand her eigentlich ältere E18-Niere. Der Gefäßbaum der beiden Nieren zeigt einen etwa gleichen Entwicklungszustand an (Abbildung 3.1).

Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Elterntiere terminlich verpaart wurden, der Befruchtungszeitpunkt aber nicht eindeutig bestimmt werden kann. Es ist in dieser Arbeit lediglich eine Eingrenzung auf 24 Stunden möglich. Demnach kann es sich bei den im Entwicklungsstadium E17 und E18 betrachteten Versuchsnieren um eine Niere im späten Entwicklungsstadium E17 handeln, wohingegen bei der Niere vom Tag E18 ein sehr frühes Stadium untersucht wurde.

Zudem schwankt die Ernährungssituation der einzelnen Tiere eines Wurfs. Bei einem Wurf mit weniger Embryonen sind diese meist im Bezug auf die Nährstoffsituation besser versorgt, als bei größeren Würfen. Dies wirkt sich sowohl auf die Größe des ganzen Embryos aus, als auch auf die Größe seiner Organe.

Die für diese Studie verwendeten Tiere bzw. ihre Muttertiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, wie viel jedes einzelne Tier in einem bestimmtem Zeitraum getrunken hat, kann aber nicht angegeben werden. Demnach ist nichts über den intravasalen Volumenzustand eines Versuchstieres bekannt. Eine chronische Überwässerung führt zum Verlust der Fähigkeit den Urin zu konzentrieren (De Wardener und Herxheimer, 1957). Im Gegensatz dazu ist der Körper darum bemüht, in Situationen, die mit einer Dehydratation einhergehen, möglichst viel Wasser und Elektrolyte zu retinieren, indem er den Urin konzentriert (Epstein et al., 1957; Jones und de Wardener, 1956). Bei einer Überwässerung des Tieres nimmt zunächst die mRNA-Expression von AQP2 ab (Ecelbarger et al., 1997, Nishimura et al. 2007). Dies wiederum führt zu einer verminderten Proteinproduktion (Ecelbarger et al.,

1997). Mäuse trinken nur soviel Wasser bis ihr Durst gestillt ist. Wie viel Zeit zwischen der letzten Flüssigkeitsaufnahme und der Tötung der Versuchstiere liegt, ist unbekannt. Die Auswirkungen normalen Trinkverhaltens auf die AQP2-Expression sind noch nicht ausreichend erforscht.

Amlal et al. (2001) beschäftigten sich in einer Studie mit dem Zusammenhang von Fasten und Polyurie. Dabei stellte die Arbeitsgruppe bei Ratten fest, dass bereits ein Nahrungsentzug von 24 Stunden ausreicht, um die AQP2-Expression in den Sammelrohren des Kortex um 60% zu reduzieren, im Bereich der äußeren Medulla um 80%. Eine geringfügige Erniedrigung von AQP2 in der Niere des Versuchstieres vom Embryonaltag 18 lässt sich im Hinblick auf die Ergebnisse von Amlal et al. (2001) mit einer im Bereich von Stunden liegenden Nahrungskarenz des Muttertieres erklären. Auch diese Aspekte müssen bei der AQP2-Quantifizierung bedacht werden.

Es muss berücksichtigt werden, dass die Volumenberechnung für AQP2 nur semiquantitativ gewertet werden kann. Alle Organe und alle Schnitte wurden gemäß dem Versuchsprotokoll gleich behandelt, sie wurden aber nicht zusammen bearbeitet. Bei der Bearbeitung der Organe, d. h. beim Färben, Fotografieren und bei der Rekonstruktion, sind geringfügige Signalabweichungen vom tatsächlichen AQP2-Volumen möglich.

4.6 Ausblick

AQP2 tritt bei der Maus zum ersten Mal am Embryonaltag 16 in Erscheinung. Im weiteren Verlauf der Embryogenese findet eine zunehmende Steigerung der Produktion dieses Kanalproteins statt. Erst im Adultzustand ist das volle Ausmaß der in die Plasmamembran eingebauten bzw. in intrazellulären Vesikeln gespeicherten Proteinmenge erreicht. Durch den Mangel an AQP2 besteht ein Defizit bei der Konzentrierung des Urins.

Auch bei anderen Säugetieren ist das Konzentrationsvermögen eingeschränkt (Baum et al., 1998; Robben et al., 2006).

Demnach haben neugeborene Tiere und Menschen ähnliche Probleme wie Individuen mit einem genetisch bedingten Diabetes insipidus.

Eine interessante Fragestellung für eine weiterführende Studie ist, wie der dreidimensionale Aufbau anderer Tubuli aussieht und ob es einen Unterschied bei gesunden und an Diabetes insipidus erkrankten Tieren gibt.

In dieser Arbeit wurden Sammelrohre mit Hilfe von AQP2 als Markerprotein dargestellt. Wie an Hand der Rekonstruktionen verschiedener Entwicklungsstadien zu erkennen ist, steigt die Zahl der mit AQP2 beladenen Sammelrohre. Eine interessante Frage ist, ob diese Sammelrohre zum betrachteten Zeitpunkt bereits entstanden waren und AQP2 im Laufe der Entwicklung erst entstehen muss oder ob die Sammelrohre erst allmählich gebildet werden und AQP2 zeitgleich exprimiert wird. Diese Fragestellung könnte mit Hilfe einer Kofärbung gegen AQP2 und einem anderen Marker des Sammelrohrsystems, z. B. gegen AQP6 in den Zwischenzellen, geklärt werden.

5 Zusammenfassung

AQP2 ist ein Kanalprotein in den Hauptzellen der Sammelrohre. Es wird Vasopressin-abhängig in die apikale Plasmamembran eingebaut, um Wasser aus dem Tubuluslumen zu resorbieren. Wenn kein Bedarf an AQP2-Kanälen besteht, wird es in intrazellulären Vesikeln gespeichert.

Die Entstehung der Sammelrohre ist zum Teil bereits erforscht. Über ihren dreidimensionalen Aufbau innerhalb der Niere ist aber noch wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde an Hand dreidimensionaler Modelle die AQP2-Expression und seine räumliche Verteilung im Laufe der Nierenentwicklung bei der Maus vom Embryonaltag 16 bis zum Adultzustand untersucht. Mit Hilfe der Signale von AQP2 wurden Rückschlüsse auf die Entwicklung und den Aufbau des Sammelrohrsystems gezogen.

Es wurde festgestellt, dass AQP2 erstmals am Embryonaltag 16 exprimiert wird. Zunächst ist es im Bereich der äußeren Medulla und des Kortex in großlumigen Sammelrohren lokalisiert. Im Laufe der Entwicklung wird AQP2 im ganzen Sammelrohrsystem exprimiert, wobei im Bereich der inneren Medulla und der Papille besonders viel AQP2 gefunden wird, da alle Sammelrohre ausschließlich über die Papille in das Nierenbecken münden. AQP2 ist gemäß seiner Funktion als Kanalprotein zur Wasserresorption aus dem Sammelrohrumen in die Hauptzellen der Sammelrohre stets vorwiegend an der apikalen Plasmamembran lokalisiert. AQP2 konnte zunächst im Bereich der Papille, bei adulten Tieren im gesamten Organ basolateral gefunden werden. Eine vesikuläre Speicherung wurde in weiterentwickelten Stadien nachgewiesen.

Eine im Verhältnis zum Nierenwachstum überproportionale Zunahme des AQP2-Volumens wurde sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Niveau festgestellt.

In Übereinstimmung mit der angegebenen Literatur kann bestätigt werden, dass sich das Sammelrohrsystems durch Teilungen aus der Ureterknospe entwickelt. Das Sammelrohrsystem ist vor allem im Zentrum der Niere lokalisiert, wobei dieser Bereich frei von größeren arteriellen Gefäßen ist.

6 Literaturverzeichnis

- Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ.** The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. *J Biol Chem* 273: 14659–14662, 1998
- Amlal H, Chen Q, Habo K, Wang Z, Soleimani M.** Fasting downregulates renal water channel AQP2 and causes polyuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(3): 513-523, 2001
- Baum MA, Ruddy MK, Hosselet CA, Harris HW.** The Perinatal Expression of Aquaporin-2 and Aquaporin-3 in Developing Kidney. *Pediatric Research* 43: 783-790, 1998
- Bedford JJ, Leader JP, Walker RJ.** Aquaporin expression in normal human kidney and in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 14(10): 2581-2587, 2003
- Brown D.** The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(5): 893-901, 2003
- Burrow CR.** Regulatory molecules in kidney development. *Pediatr Nephrol* 14: 240-253, 2000
- Cebrián C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA.** Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn* 231(3): 601–608, 2004
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- Chou, CL, Yip KP, Michea L, Kador K, Ferraris JD, Wade JB, Knepper MA.** Regulation of aquaporin-2 trafficking by vasopressin in the renal collecting duct. Roles of ryanodine-sensitive Ca^{2+} stores and calmodulin. *J Biol Chem* 275: 36839-36846, 2000
- Clark AT, Bertram JF.** Molecular regulation of nephron endowment. *Am J Physiol* 276: 485-497, 1999
- Constantini F.** Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. *Differentiation* 74: 402-421, 2006

Deen PM, Van Balkom BW, Savelkoul PJ, Kamsteeg EJ, Van Raak M, Jennings ML, Muth TR, Rajendran V, Caplan MJ. Aquaporin-2: COOH terminus is necessary but not sufficient for routing to the apical membrane. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: 330–340, 2002

De Wardener HE, Herxheimer A. The effect of a high water intake on the kidney's ability to concentrate the urine in man. *J Physiol (Lond)* 139: 42-52, 1957

DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8984-8988, 1994

Earm JH, Christensen BM, Frøkiær J, Marples D, Han JS, Knepper MA, Nielsen S. Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J Am Soc Nephrol* 9: 2181–2193, 1998

Ecelbarger CA, Nielsen S, Olson BR, Murase T, Baker EA, Knepper MA, Verbalis JG. Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rat. *J Clin Invest* 99: 1852-1863, 1997

Echevarria M, Windhager EE, Tate SS, Frindt G. Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10997-11001, 1994

Epstein FH, Kleeman CR, Hendrikx A. The influence of bodily hydration on the renal concentrating process. *J Clin Invest* 36: 629-634, 1957

Fushimi K, Sasaki S, Marumo F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J Biol Chem* 272: 14800–14804, 1997

Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361: 549-552, 1993

Georgas K, Rumballe B, Wilkinson L, Chiu HS, Lesieur E, Gilbert T, Little MH. Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney. *Histochem Cell Biol* DOI 10.1007/s00418-008-0454-3 123

Greger RF, Knauf H, Mutschler E. Diuretics, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1995

Hoffert JD, Nielsen J, Yu MJ, Pisitkun T, Schleicher SM, Nielsen S, Knepper MA. Dynamics of aquaporin-2 serine-261 phosphorylation in response to short-term vasopressin treatment in collecting duct *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 691-700, 2007

Horster M, Huber S, Tschöp J, Dittrich G, Braun G. Epithelial nephrogenesis. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 434: 647-660, 1997

Ishibashi K, Sasaki S, Fushimi K, Uchida S, Kuwahara M, Saito H, Furukawa T, Nakajima K, Yamaguchi Y, Gojobori T, Marumo F. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6269-6273, 1994

Jones RVH, de Wardener HE. Urine concentration after fluid deprivation or pitressin tannate in oil. *Br Med J* 1 (4961): 271-274, 1956

Jung JS, Preston GM, Smith BL, Gugginoll WB, Agre P. Molecular Structure of the Water Channel through Aquaporin CHIP. *J Biol Chem* 269 (20): 14648-14654, 1994

Kamsteeg EJ, Heijnen I, van Os CH, Deen PM. The subcellular localization of an aquaporin-2 tetramer depends on the stoichiometry of phosphorylated and nonphosphorylated monomers. *J Cell Biol* 151: 919–930, 2000

Kanwar YS, Wada J, Lin S, Danesh FR, Chugh SS, Yang Q, Banerjee T, Lomasney JW. Update of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 202–215, 2004

Kishore BK, Mandon B, Oza NB, DiGiovanni SR, Coleman RA, Ostrowski NL, Wade JB, Knepper MA. Rat renal arcade segment expresses vasopressin-regulated water channel and vasopressin V₂ receptor. *J Clin Invest* 97: 2763-2771, 1996

Kwon TH, Laursen UH, Marples D, Maunsbach AB, Knepper MA, Frøkiaer J, Nielsen S. Altered expression of renal AQP_s and Na⁺ transporters in rats with lithium-induced NDI. *Am J Physiol* 279: 552–564, 2000

Krane CM, Goldstein DL. Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. *Mamm Genome* 18:452–462, 2007

Kuure S, Vuolteenaho R, Vainio S. Kidney morphogenesis. Cellular and molecular regulation. *Mechanism of Development* 92: 31-45, 2000

Li C, Wang W, Knepper MA, Nielsen S, Frøkiaer J. Downregulation of renal aquaporins in response to unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*; 284(5): 1066-1079, 2003

Li C, Wang W, Kwon TH, Isikay L, Wen JG, Marples D, Djurhuus JC, Stockwell A, Knepper MA, Nielsen S, Frøkiaer J. Downregulation of AQP1, -2, and -3 after ureteral obstruction is associated with a long-term urine-concentrating defect. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: 163–171, 2001

Loffing J, Loffing-Cueni D, Macher A, Herbert SC, Olson B, Knepper MA, Rossier BC, Kaissling B. Localization of epithelial sodium channel and aquaporin-2 in rabbit kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(4): 530-539, 2000

Maric K, Oksche A, Rosenthal W. Aquaporin-2 expression in primary cultured rat inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: 796-801, 1998

Marples D, Christensen S, Christensen EI, Ottosen PD, Nielsen S. Lithium-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla. *J Clin Invest* 95: 1838–1845, 1995

- Marples D, Frøkiær J, Dørup J, Knepper MA, Nielsen S.** Hypokalemia-induced downregulation of aquaporin-2 water channel expression in rat kidney medulla and cortex. *J Clin Invest* 97: 1960–1968, 1996
- Mulders SM, Bichet DG, Rijss JP, Kamsteeg EJ, Arthus MF, Lonergan M, Fujiwara M, Morgan K, Leijendekker R, van der Sluijs P, van Os CH, Deen PM.** An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J Clin Invest* 102: 57–66, 1998
- Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA.** Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1013-1017, 1995
- Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW.** Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11663-11667, 1993
- Nielsen S, Frøkiær J, Marples D, Kwon T, Agre P, Knepper MA.** Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine. *Physiol Rev* 82(1): 205-244, 2002
- Nielsen S, Kwon T, Christensen BM, Promeneur D, Frøkiær J, Marples D.** Physiology and Pathophysiology of Renal Aquaporins. *Am Soc Nephrol* 10: 647–663, 1999
- Nielsen S, Smith B, Christensen EI, Knepper MA, Agre P.** CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol* 120: 371-383, 1993
- Nishimoto G, Zelenina M, Li D, Yasui M, Aperia A, Nielsen S, Nairn AC.** Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: 254–259, 1999
- Nishimura H, Yang Y, Lau K, Kuykindoll RJ, Fan Z, Yamaguchi K, Yamamoto T.** Aquaporin-2 water channel in developing quail kidney: possible role in programming adult fluid homeostasis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 293: 2147-2158, 2007

Noda Y, Sasaki S. Molecular Mechanisms and Drug Development in Aquaporin Water Channel Diseases: Molecular Mechanism of Water Channel Aquaporin-2 Trafficking. *J Pharmacol Sci* 96: 249–254, 2004

Ohara M, Martin PY, Xu DL, St. John J, Pattison TA, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of aquaporin 2 water channel expression in pregnant rats. *J Clin Invest* 101: 1076–1083, 1998

Pannabecker TL, Abbott DE, Dantzler WH. Three-dimensional functional reconstruction of inner medullary thin limbs of Henle's loop. *Am J Physiol Renal Physiol*; 286(1): 38-45, 2004

Petrović MM, Vales K, Stojan G, Basta-Jovanovic G, Mitrovic DM. Regulation of Selectivity and Translocation of Aquaporins: an Update. *Folia Biologica (Praha)* 52: 173-180, 2006

Phillips ME, Taylor A. Effect of nocodazole on the water permeability response to vasopressin in rabbit collecting tubules perfused in vitro. *J Physiol (Lond)* 411: 529-544, 1989

Phillips ME, Taylor A. Effect of colcemid on the water permeability response to vasopressin in isolated perfused rabbit collecting tubules. *J Physiol (Lond)* 456: 591-608, 1992

Robben JH, Knoers NVAM, Deen PMT. Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: 257–270, 2006

Rojek A, Füchtbauer EM, Kwon TH, Frøkiær J, Nielsen S. Severe urinary concentrating defect in renal collecting duct-selective AQP2 conditional-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(15): 6037-6042, 2006

Sands JM, Bichet DG, American College of Physicians, American Physiological Society. Nephrogenic diabetes insipidus. *Ann Intern Med* 144(3): 186-194, 2006

Sands JM, Flores FX, Kato A, Baum MA, Brown EM, Ward DT, Hebert SC, Harris HW. Vasopressin-elicited water and urea permeabilities are altered in IMCD in hypercalcemic rats. *Am J Physiol* 274: 978–985, 1998

Saparov SM, Liu K, Agre P, Pohl P. Fast and selective ammonia transport by Aquaporin-8. *J Biol Chem* 282(8): 5296-5301, 2007

Sauter A, Machura K, Neubauer B, Kurtz A, Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney International* 73: 43-51, 2007

Saxén L. Organogenesis of the kidney. *Developmental and cell biology series. Cambridge University Press, Cambridge* 1-34, 1987

Schiebler TH, Schmidt W. Anatomie. Springer Verlag Heidelberg, 2003, 8. Auflage, S.593-604

Schmidt RF, Lang F, Thews G. Physiologie des Menschen. Springer Verlag Heidelberg, 2005, 29. Auflage, S.668-702

Schrier RW. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol* 17(7): 1820-1832, 2006

Shi PP, Cao XR, Qu J, Volk KA, Kirby P, Williamson RA, Stokes JB, Yang B. Nephrogenic diabetes insipidus in mice caused by deleting COOH-terminal tail of aquaporin-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: 1334–1344, 2007

Stuart RO, Barros EJG, Ribeiro E, Nigam SK. Epithelial Tubulogenesis Through Branching Morphogenesis: Relevance to Collecting System Development. *J. Am. Soc. Nephrol* 6:1151-1159, 1995

Tajika Y, Matsuzaki T, Suzuki T, Aoki T, Hagiwara H, Kuwahara M, Sasaki S, Takata K. Aquaporin-2 is retrieved to the apical storage compartment via early endosomes and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 145: 4375–4383, 2004

Takata K, Tajika Y, Matsuzaki T, Aoki T, Suzuki T, Abduxukur A, Hagiwara H.

Molecular Mechanisms and Drug Development in Aquaporin Water Channel Diseases: Water Channel Aquaporin-2 of Kidney Collecting Duct Cells. *J Pharmacol Sci* 96: 255–259, 2004

Tian Y, Serino R, Verbalis JG. Downregulation of renal vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 expression parallels age-associated defects in urine concentration. *Am J Physiol Renal Physiol*; 287(4): 797-805, 2004

van Balkom BW, Graat MP, van Raak M, Hofman E, van der Sluijs P, Deen PM. Role of cytoplasmic termini in sorting and shuttling of the aquaporin-2 water channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: 372–379, 2004

Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science* 118: 3225-3232, 2005

Wallner EI, Yang Q, Peterson DR, Wada J, Kanwar YS. Relevance of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: 467-477, 1998

Xu DL, Martin PY, Ohara M, St John J, Pattison T, Meng X, Morris K, Kim JK, Schrier RW. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J Clin Invest* 99(7): 1500-1505, 1997

Yasui M, Kwon TH, Knepper MA, Nielsen S, Agre P. Aquaporin-6: an intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5808-5813, 1999

Zelenina M, Christensen BM, Palmér J, Nairn AC, Nielsen S, Aperia A. Prostaglandin E2 interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: 388-394, 2000

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Zeichnung der frühen Entwicklung des menschlichen Nierenbeckens (nach Saxén, 1987)	7
Abbildung 1.2: Wechselwirkungen zwischen den undifferenzierten Mesenchymzellen und der Ureterknospe (nach Kanwar et al., 2004).....	8
Abbildung 1.3: Nephronentwicklung (nach Saxén, 1987).....	9
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Entwicklung eines unreifen Nephrons (nach Saxén, 1987).....	10
Abbildung 1.5: Makroskopische Gliederung der Nierenzonen. C: Kortex, OS: äußerer Streifen der äußeren Medulla, IS: innerer Streifen der äußeren Medulla, IM: Innere Medulla, P: Papille, U: Ureter (Greger et al., 1995)	11
Abbildung 1.6: Expression einzelner Aquaporine bei Säugetieren (nach Verkman, 2005)	13
Abbildung 1.7: Die Verteilung der verschiedenen Aquaporine innerhalb des Tubulussystems. AQP1: proximaler Tubulus und absteigender Teil der Henle-Schleife. AQP2: Hauptzellen der Sammelrohre, apikal. AQP3/AQP4: Hauptzellen der Sammelrohre, basolateral. AQP7: apikaler Bürstensaum des geraden Anteils des proximalen Tubulus. (nach Nielsen et al., 2002).....	15
Abbildung 1.8: Aminosäureaufbau des Kanalproteins Aquaporin2 (nach Robben et al., 2006)	16
Abbildung 1.9: Modell für die Kanalbildung von Aquaporinen. Die Schleifen B und E treten in die Plasmamembran ein. Die Aminosäuresequenz NPA bildet eine Pore, durch die Wasser aus dem Lumen in die Zelle fließen kann. (nach Nielsen et al., 2002)	16
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Aktivierung (A,B) und des Recyclings (C) von AQP2.....	18
Abbildung 2.1: Antigen-Antikörper-Reaktion	33
Abbildung 2.2: Datensegmentierung mittels Amira. Gezeigt sind AQP2- Signale im Entwicklungsstadium E17.....	37
Abbildung 2.3: Oberfläche einer Niere im Entwicklungsstadium E18. In rot ist das Gefäßsystem dargestellt. Mit grün wurde AQP2 markiert. Nierenbecken und Ureter sind in blau dargestellt. Die Glomeruli sind gelb markiert.	38
Abbildung 3.1: Überblick über die 3-D-Rekonstruktion des arteriellen Gefäßsystems	43
Abbildung 3.2: 3-D-Rekonstruktion einer Niere im Entwicklungsstadium E16. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.	44

Abbildung 3.3: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag E17. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.	45
Abbildung 3.4: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag E18. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.	46
Abbildung 3.5: 3-D-Rekonstruktion einer Niere am Entwicklungstag pp3. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.	47
Abbildung 3.6: 3-D-Rekonstruktion einer Niere im Adultzustand. AQP2: grün. Arterieller Gefäßbaum: rot. Nierenbecken, Ureter: blau. Glomeruli: gelb. Kapsel: transparent.....	48
Abbildung 3.7: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E16. Kapsel (transparent), Nierenbecken (blau), Ureter (blau).	49
Abbildung 3.8: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E16. AQP2-Signale finden sich vor allem in Anschnitten größerer Sammelrohre.	50
Abbildung 3.9: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E17. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau).	51
Abbildung 3.10: Aquaporin2 (grün) im Entwicklungsstadium E18. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau).	52
Abbildung 3.11: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E18. AQP2 (weiß) markiert die Hauptzellen der Sammelrohre. Die Sammelrohre teilen sich im Bereich der Papille und der inneren Medulla (rote Kreise) und verlaufen im Kortex und der äußeren Medulla über längere Strecken gerade (weiße Pfeile).	53
Abbildung 3.12: Längsschnitt durch eine Niere im Stadium E17. AQP2 (weiß) markiert die Hauptzellen der Sammelrohre. An Hand roter Kreise ist die Anordnung kleiner Sammelrohre des Kortex in Gruppen zu zwei bzw. drei Sammelrohren hervorgehoben.	54
Abbildung 3.13: Aquaporin2 (grün) drei Tage nach der Geburt. Kapsel (transparent), Nierenbecken und Ureter (blau). Ausschnitt zusammengesetzt aus 200 Querschnitten à 5 µm aus der Mitte des Organs.	55
Abbildung 3.14: Histologischer Querschnitt durch eine Niere am postpartalen Tag drei. AQP2-Signale sind weiß dargestellt. Mit roten Pfeilen sind Verzweigungsstellen im Sammelrohrsystem gekennzeichnet.	56

Abbildung 3.15: Histologischer Querschnitt durch eine Niere im Stadium pp3. AQP2-Signale sind weiß dargestellt. Rote Kreise markieren die gruppenförmige Anordnung kleiner Sammelrohre im Bereich des Kortex.	56
Abbildung 3.16: Aquaporin2 (grün) in der adulten Niere. Kapsel (transparent), Nierenbecken (blau). Modell zusammengesetzt aus 198 Querschnitten à 5 µm aus der Mitte des Organs.	57
Abbildung 3.17: Links: Querschnitt durch eine Niere im Stadium pp3. Rechts: Querschnitt durch eine adulte Niere. Es wurden jeweils Schnitte aus der Mitte des Organs gewählt. In weiß sind alle AQP2-Signale dargestellt. Die AQP2-Expression nimmt v. a. im Kortexbereich zu. Alle Sammelrohre münden via Papille in das Nierenbecken.	58
Abbildung 3.18: Immunfluoreszenzfärbung der Stadien E16, E17, E18, pp3 und adult. Rot: Glattmuskelaktin, grün: AQP2. CD: Sammelrohr. A: Arterie. G: Glomerulum. M: Mesenchym. In den Stadien E16, E17 und E18 sind Längsschnitte gezeigt. Bei den Stadien pp3 und adult handelt es sich um Querschnitte.	60
Abbildung 3.19: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E16	61
Abbildung 3.20: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E17 (V: Vesikel, b: basolateral)	62
Abbildung 3.21: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Stadium E17 (V: Vesikel, b: basolateral)	63
Abbildung 3.22: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 im Stadium E18	64
Abbildung 3.23: Intrazelluläre Lokalisation von AQP2 drei Tage nach der Geburt (V: Vesikel, b: basolateral, a: apikal, Z: Zwischenzelle)	65
Abbildung 3.24: Vergrößerter Ausschnitt aus dem Stadium pp3 (V: Vesikel, b: basolateral)	65
Abbildung 3.25: Intrazelluläre Verteilung von AQP2 im Adultzustand (V: Vesikel, Z: Zwischenzelle, b: basolateral, a: apikal)	66
Abbildung 3.26: Entwicklung des Nierenvolumens. Bestimmt an Hand der Rekonstruktion der Kapsel und des Nierenbeckens durch die Computersoftware Amira.....	67
Abbildung 3.27: Entwicklung des Gefäßvolumens. Bestimmt an Hand der Aktinpixel mit Hilfe der Computersoftware Amira.....	68
Abbildung 3.28: AQP2-Protein-Volumen. Bestimmt an Hand der Pixel der Signale gegen AQP2 durch die Computersoftware Amira.	69
Abbildung 3.29: AQP2-Gesamt-RNA im Laufe der Entwicklung der Mausniere	70
Abbildung 3.30: AQP2-RNA-Abundanz	71

8 Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
%	Prozent
µm	Mikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
µl	Mikroliter
A	Asparagin
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
ADH	Antidiuretisches Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
AQP	Aquaporin
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
CAM	cell adhesion molecule
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge-couplet Device
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cy2	Carbocyanin
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	Desosyguanosintriphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E	embryonaler Tag
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA1	early endosome antigen-1

et al.	und andere (et alii)
Fc	Fragment constant
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GF	Growth Factor
GTP	Guanosintriphosphat
HS	Horse Serum
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
I. E.	Internationale Einheit
i. p.	intra peritoneum
k	Kilo
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	minimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
P	Prolin
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	pH-Wert (pondus Hydrogenii)
PKA	Proteinkinase A
pmol	picomol

PP	postpartal
Rab 11	Marker für ein apikales Recyclingendosom
RGB	RotGrünBlau
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SSRI	Selektiver Serotonin Wiederaufnahmehemmer (selective serotonin reuptake inhibitor) = Antidepressivum
TIFF	Tagget Image File Format
TRITC	Tetramethylrhodamin
U	Unit
V.	Vena
V2-Rezeptor	Vasopressin 2-Rezeptor
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
zvi	Zeiss Vision Image

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz für die Vergabe dieses interessanten Themas und für die Bereitstellung aller benötigten Arbeitsmittel und Geräte. Vielen Dank auch dafür, dass Sie bei allen Fragen und Problemen stets Zeit für mich hatten.

Für ihre fachliche Unterstützung, für die Bereitstellung von in Paraffin eingebetteten Organen und für ihre fortwährende Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. rer. nat. Katharina Machura bedanken. Vielen Dank auch dafür, dass du diese Arbeit Korrektur gelesen hast.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner, für Informationen über die Entwicklung der Mausniere zu Beginn dieser Arbeit und dafür, dass sie diese Arbeit Korrektur gelesen hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl. biol. Björn Neubauer, der mir stets bei allen technischen und fachlichen Problemen kompetent zur Seite stand.

Für die Anleitung im Histolabor möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Anna M'Bangui bedanken.

Für die molekularbiologischen Ergebnisse gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Klaus Höcherl.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für das angenehme Arbeitsklima, für ihre Freundlichkeit und kollegiale Atmosphäre und für die vielen kleinen Tipps und Tricks bei der Bewältigung des Laboralltags danken.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Martina Maier